



P23889.P08

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Jun IMAMURA et al.

Appln No. : 10/613,053 Group Art Unit : 1642

Filed : July 7, 2003 Examiner :

For : PROTEIN INVOLVED IN RESTORATION OF CYTOPLASMIC MALE STERILITY  
TO FERTILITY AND GENE ENCODING THE PROTEIN AND GENE

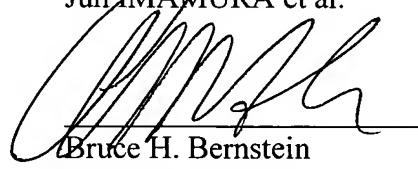
**SUPPLEMENTAL CLAIM OF PRIORITY  
SUBMITTING CERTIFIED COPY**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, Virginia 22313-1450

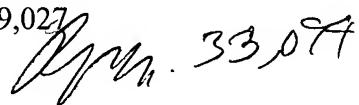
Sir:

Further to the Claim of Priority filed July 7, 2003 and as required by 37 C.F.R. 1.55,  
Applicant hereby submits a certified copy of the application upon which the right of priority is  
granted pursuant to 35 U.S.C. §119, i.e., of Japanese Application Nos. 2001-128008, filed April 25,  
2001; 2001-202082, filed July 3, 2001; and 2002-20083, filed January 29, 2002.

Respectfully submitted,  
Jun IMAMURA et al.



Bruce H. Bernstein  
Reg. No. 29,027



33,074

December 15, 2003  
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.  
1950 Roland Clarke Place  
Reston, VA 20191  
(703) 716-1191

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2001年 4月25日  
Date of Application:

出願番号 特願2001-128008  
Application Number:

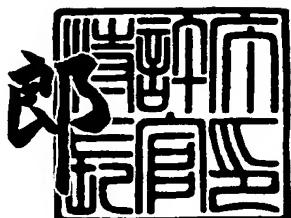
[ST. 10/C] : [JP2001-128008]

出願人 三菱化学株式会社  
Applicant(s):

2003年 7月10日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一



出証番号 出証特2003-3056162

【書類名】 特許願  
【整理番号】 A11143MA  
【提出日】 平成13年 4月25日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N  
【発明の名称】 細胞質雄性不稔から可稔への回復に関する遺伝子  
【請求項の数】 12  
【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社  
植物工学研究所内  
【氏名】 今村 順  
【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社  
植物工学研究所内  
【氏名】 藤本 英也  
【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社  
植物工学研究所内  
【氏名】 今井 りつ子  
【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社  
植物工学研究所内  
【氏名】 肥塚 信也  
【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社  
植物工学研究所内  
【氏名】 酒井 隆子

## 【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社  
植物工学研究所内

【氏名】 早川 孝彦

## 【特許出願人】

【識別番号】 000005968

【氏名又は名称】 三菱化学株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100096219

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 今村 正純

【連絡先】 03-3271-1331

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100092635

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100095843

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 釜田 淳爾

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100104477

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 藍原 誠

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 038357

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞質雄性不稔から可稔への回復に関与する遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の何れかのDNA。

- (1) 配列番号1に記載の塩基配列を有するDNA；
- (2) 配列番号1に記載の塩基配列において1から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA；又は
- (3) 配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAとストリングエントな条件下ハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA。

【請求項2】 下記の何れかのDNA。

- (1) 配列番号2に記載の塩基配列を有するDNA；
- (2) 配列番号2に記載の塩基配列において1から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA；又は
- (3) 配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAとストリングエントな条件下ハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA。

【請求項3】 下記の何れかのタンパク質をコードするDNA。

- (1) 配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；又は
- (2) 配列番号3に記載のアミノ酸配列において1から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。

【請求項4】 細胞質雄性不稔個体が、コセナダイコン及び／又はオグラダイコンの細胞質雄性不稔遺伝子又はそのホモログを有するものである、請求項1から3の何れか1項に記載のDNA。

【請求項5】 下記の何れかのタンパク質。

- (1) 配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；又は

(2) 配列番号3に記載のアミノ酸配列において1から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。

**【請求項6】** 細胞質雄性不稔個体が、コセナダイコン及び／又はオグラダイコンの細胞質雄性不稔遺伝子又はそのホモログを有するものである、請求項5に記載のタンパク質。

**【請求項7】** 請求項1から4の何れかに記載のDNAを含有するベクター。

**【請求項8】** 請求項1から4の何れかに記載のDNA又は請求項7に記載のベクターを有する形質転換体。

**【請求項9】** 形質転換植物である、請求項8に記載の形質転換体。

**【請求項10】** 請求項1から4の何れかに記載のDNAを用いることを特徴とする、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復する方法。

**【請求項11】** 細胞質雄性不稔遺伝子を有し、かつ、請求項1から4の何れかに記載のDNAを有する細胞に、さらに請求項1から4の何れかに記載のDNAの一部又は全部を誘導型プロモーターと共に導入することにより、雄性不稔回復遺伝子の発現を制御することが可能となった形質転換体。

**【請求項12】** 請求項11に記載の形質転換体を利用することによる細胞質雄性不稔系統の維持方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

##### 【産業上の利用分野】

本発明は、細胞質雄性不稔から可稔への回復に関与する遺伝子に関する。より詳細には、本発明は、一代雑種（以下、F<sub>1</sub>と略す）品種開発のために利用される細胞質雄性不稔形質（以下、cmsと略すことがある）の回復に関与する遺伝子、当該遺伝子を含有するベクター及び形質転換体に関するものである。

##### 【0002】

##### 【従来技術】

禾穀類、野菜などの農作物では、1) 雜種強勢による優れた農業形質、2) 収

穫物の均一性、3) 次世代で遺伝形質が分離するため品種育成者の利益が保護される、などの特徴のもと、F<sub>1</sub>品種の開発が盛んであり、多くの主要作物で実用化されている。

#### 【0003】

F<sub>1</sub>品種の種子を生産するための方法の一つとしては、細胞質雄性不稔 (c m s) 系統とその雄性不稔を回復する (以下、R<sub>f</sub>と略すことがある) 系統からなるc m s-R<sub>f</sub>採種システムがあり、例えばイネ、ソルガム、トウモロコシ等の禾穀類や例えばひまわりなどの油量作物で開発されているが、これらはいずれも、交配あるいは細胞融合の手法を用いて開発されたものである。

#### 【0004】

一方、アブラナ科では、自家不和合性を用いたF<sub>1</sub>採種システムが広く利用されているが、ナタネに関しては、安定な自家不和合性のないため、c m s系系統とR<sub>f</sub>系系統を利用したF<sub>1</sub>採種システムが求められている。

#### 【0005】

これに対して、近年、コセナダイコン由来の細胞質雄性不稔 (コセナc m s) やオグラダイコン由来の細胞質雄性不稔 (オグラc m s) をナタネで利用する研究がなされている。両c m s遺伝子に関しては細胞質小器官であるミトコンドリアのゲノムにコードされており、塩基配列についても知られているが、ダイコンは、分子生物学的な研究が進んでおらず、遺伝子単離に必要なマーカーもほとんど知られていない状態であるため、核からの遺伝子の単離が困難であり、R<sub>f</sub>に関しては、ダイコンの稔性回復系統から交配あるいは細胞融合の手法を使いナタネに導入されているのみである。

#### 【0006】

さらに、R<sub>f</sub>遺伝子に関しては、植物の各c m s系系統により、1つ又は複数の回復遺伝子があることが知られており、ダイコンではR<sub>f</sub>1及びR<sub>f</sub>2が同時に存在することが稔性回復に必要であるが、ナタネではR<sub>f</sub>1遺伝子単独で稔性を回復できるということまでは知られている (育種学雑誌 47 (別1) P186, 1997、育種学雑誌48 (別1) P197, 1998) が、その制御機構はほとんど解明されていない。

また、その塩基配列についても、トウモロコシのc m sの一つであるT-サイトプラズムに対する回復遺伝子の一つであるRf2遺伝子のみについては同定、単離されているが、他の植物でRf遺伝子の塩基配列については、全く知られていない。

### 【0007】

#### 【発明が解決するための課題】

交配あるいは細胞融合によりRf1遺伝子を導入したナタネ回復系統とその系統を父親として作出されたF1品種は、グルコシノレート（以下GSLと略す）含量が、規制値より高くなることがわかり、実用上問題となっている。GSLの生合成に関与するダイコン由来の遺伝子がRf1遺伝子の近傍に存在し、遺伝的に強連鎖しているため、ナタネの回復系統（Rf系統）ではGSLの含量が上昇すると考えられている。GSLはナタネの搾油かすに含まれ、それを飼料として動物に与えたとき、甲状腺肥大をもたらすことが知られているため、ナタネ種子のGSL含量は育種段階では北米で、18μmole/g ヨーロッパでは20μmole/g以下にすることが求められている。

### 【0008】

さらに、近年では、除草剤耐性等の機能を遺伝子組換えにより付加した植物の開発も活況であり、これらの植物を効率的に創出するためには、交配あるいは細胞融合により得られたナタネ回復系の存在のみでは不十分であり、Rf遺伝子、特に、ダイコン由来のRf1遺伝子の単離が望まれていた。

### 【0009】

即ち、本発明は、Rf遺伝子、特に、ダイコン由来のRf1遺伝子を単離してその構造を同定することを解決すべき課題とした。さらに、本発明は、単離したRf遺伝子を利用してナタネ回復系統を確立する手段を提供することを解決すべき課題とした。

### 【0010】

#### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、ダイコンからRf1遺伝子をクローニングすることに成功し、本課題を解決するに至った。

すなわち、本発明によれば、下記の何れかのDNAが提供される。

- (1) 配列番号1に記載の塩基配列を有するDNA；
- (2) 配列番号1に記載の塩基配列において1から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA；又は
- (3) 配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA。

#### 【0011】

本発明の別の側面によれば、下記の何れかのDNAが提供される。

- (1) 配列番号2に記載の塩基配列を有するDNA；
- (2) 配列番号2に記載の塩基配列において1から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA；又は
- (3) 配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA。

#### 【0012】

本発明のさらに別の側面によれば、下記の何れかのタンパク質をコードするDNAが提供される。

- (1) 配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；又は
- (2) 配列番号3に記載のアミノ酸配列において1から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。

本発明において好ましくは、細胞質雄性不稔個体は、コセナダイコン及び／又はオグラダイコンの細胞質雄性不稔遺伝子又はそのホモログを有する。

#### 【0013】

本発明のさらに別の側面によれば、下記の何れかのタンパク質が提供される。

- (1) 配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；又は

(2) 配列番号3に記載のアミノ酸配列において1から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。

本発明において好ましくは、細胞質雄性不稔個体は、コセナダイコン及び／又はオグラダイコンの細胞質雄性不稔遺伝子又はそのホモログを有する。

#### 【0014】

本発明のさらに別の側面によれば、本発明のDNAを含有するベクターが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明のDNA又は本発明のベクターを有する形質転換体が提供される。形質転換体は好ましくは形質転換植物である。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明のDNAを用いることを特徴とする、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復する方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、細胞質雄性不稔遺伝子を有し、かつ、本発明のDNAを有する細胞に、さらに本発明のDNAの一部又は全部を誘導型プロモーターと共に導入することにより、雄性不稔回復遺伝子の発現を制御することが可能となった形質転換体が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した形質転換体を利用することによる細胞質雄性不稔系統の維持方法が提供される。

#### 【0015】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

###### (1) 本発明のDNAの態様

本発明のDNAは、下記の何れかのDNAに関する。

- (1) 配列番号1又は配列番号2に記載の塩基配列を有するDNA；
- (2) 配列番号1又は配列番号2に記載の塩基配列において1から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA；又は
- (3) 配列番号1又は配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に

回復することに関与するDNA。

#### 【0016】

さらに本発明のDNAは、下記の何れかのタンパク質をコードするDNAに関する。

- (1) 配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；又は
- (2) 配列番号3に記載のアミノ酸配列において1から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。

#### 【0017】

本明細書では、本発明のDNAを、本発明の遺伝子と称する場合もある。

配列番号1で示される塩基配列は、8553個の塩基から成るゲノムDNA塩基配列であり、配列番号2で示される塩基配列は、配列番号1より推定されるコード配列である。配列番号3は、配列番号2で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列である。

#### 【0018】

本明細書において「1から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列」とは、例えば1～20個、好ましくは1～15個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個の任意の数の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列のことを言う。

本明細書において、「1から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列」とは、例えば1～20個、好ましくは1～15個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個の任意の数のアミノ酸が欠失、付加または置換されているアミノ酸配列のことを言う。

#### 【0019】

本明細書において「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、DNAをプローブとして使用し、コロニーハイブリダイゼーション法、プラクハイブリダイゼーション法、あるいはサザンプロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAの塩基配列を意味し、例えば、コロニーあるいはプラク由来のDNAまたは該DNAの断片を固定化したフィルタ

ーを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2×SSC溶液（1×SSCの組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウム）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNA等を挙げることができる。

#### 【0020】

ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989. 以後“モレキュラークローニング第2版”と略す)等に記載されている方法に準じて行うことができる。

#### 【0021】

ストリングエントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、プローブとして使用するDNAの塩基配列と一定以上の相同意を有するDNAが挙げられる。ここで言う一定以上の相同意とは、例えば70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは93%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは97%以上である。なお。ここで言う一定以上の相同意を有するDNAとしては、上記した相同意を有するポリヌクレオチドおよびその相補鎖ポリヌクレオチドの両方を包含する。

#### 【0022】

本発明のDNAは、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与することができるDNAである。より具体的には、本発明のDNAを遺伝子組換えの手法を用い導入した形質転換植物（Rf系統）を細胞質雄性不稔系統（cms系統）の個体と交配させることにより、稔性の回復されたF<sub>1</sub>種子を得ることができる。上記、cms系統として好ましくは、コセナcms及びオグラcmsが挙げられる。

#### 【0023】

##### (2) 本発明のDNAの取得方法

本発明のDNAの取得方法は特に限定されない。本明細書中に開示した配列番号1または配列番号2に記載の塩基配列、並びに配列番号3に記載したアミノ酸配列の情報に基づいて、当業者に公知の一般的育種手法及び一般的遺伝子工学的

手法を利用することにより、本発明のDNAを単離することができる。

#### 【0024】

具体的には、本発明の遺伝子が発現される適当な植物起源、具体的にはダイコンの品種、近縁種を含むRaphanus属の植物、より具体的にはコセナダイコン、オグラダイコン、紅園ダイコン、又はこれらのダイコンの品種や近縁種を含むRaphanus属の植物の細胞質雄性不稔回復遺伝子を含んだゲノムDNAが交配や細胞融合の手法により移入されたブラシカ属の植物、より具体的にはRfナタネから得ることができる。例えば、Rf遺伝子の近傍に位置するDNAマーカーを単離し、このDNAマーカーとRf遺伝子の遺伝距離の関係を示したゲノムの地図を作製し、ゲノムの地図を出発点としてRf領域のポジショナルクローニング法（クロモゾームウォーキングとも言う）によって、本発明の遺伝子を単離、取得できる。

#### 【0025】

この手法はゲノムDNA上に適当なDNAマーカーを見いだし、Rf遺伝子とDNAマーカーの遺伝距離を測ることでゲノムの地図を作製することから始める。DNAマーカーは父親由来のゲノムと母親由来のゲノムとを識別する必要があり、一般的には数100bpの長さからなる。またDNAマーカーは遺伝子と同一染色体上に座乗している必要があり、遺伝子との距離が近いために遺伝様式がほぼ同様となるようなもの、つまり遺伝的に強く連鎖しているマーカーほど望ましい。

#### 【0026】

DNAマーカー単離法には、以前よりRFLP法が使われていたが、近年はPCRを用いた簡便な方法であるRAPD法やAFLP (Amplified fragment length polymorphism) 法 (Nucleic Acids Research, 1995, Vol.23, No.21, 4407-4414) が利用されている。特に、AFLP法は遺伝的に強く連鎖するマーカーを得る手段として有効である。マーカーとの遺伝距離を測る材料として、通常、Rf1遺伝子を持たない劣性ホモ個体とRf1遺伝子をホモに有する優性ホモ個体を交配したF1世代を自家受粉して得られるF2集団やF1世代とこの親である目的の遺伝子を持たない劣性ホモ個体を交配して得られるBC1集団を用いることが

できる。

#### 【0027】

上記劣性ホモ個体としては、細胞質雄性不稔系統のダイコンの品種、近縁種を含むRaphanus属植物、より具体的には細胞質雄性不稔系統のコセナダイコンやオグラダイコン、又は、コセナダイコン由来の細胞質雄性不稔（コセナc m s）やオグラダイコン由来の細胞質雄性不稔（オグラc m s）が移入されたブラシカ属植物、より具体的にはc m sナタネを使用することができる。

#### 【0028】

上記優性ホモ個体としては、Rf系統であるダイコンの品種、近縁種を含むRaphanus属の植物、より具体的には細胞質雄性不稔回復系統のコセナダイコン、オグラダイコン、園紅ダイコン、又は、これらのダイコンの品種や近縁種を含むRaphanus属植物の細胞質雄性不稔回復遺伝子を含んだゲノムDNAが交配や細胞融合の手法により移入されたブラシカ属の植物、より具体的にはRfナタネを使用することができる。

#### 【0029】

これらの両親を交配して得られたF1世代を自家受粉して得られるF2集団や、F1世代と劣性ホモ個体を交配して得られるBC1集団は、通常は100個体以上、より好ましくは1000個体以上解析することが望ましく、個体数が増すほどゲノムの地図の精度が上がり、DNAマーカーから目的の遺伝子までの物理的距離が短くなる。Rf遺伝子の場合も同様に、より物理的距離が短いDNAマーカーを得ることが可能になる。

#### 【0030】

DNAマーカーとRf遺伝子の遺伝距離を測る材料としては、例えば、c m s系統コセナダイコン(Raphanus sativus cv. Kosena)とRf系統である園紅ダイコン(Raphanus sativus cv. Yuanhong)とをN. Koizuka, et al. Theor Appl Genet, 100:949-955, 2000に記載の方法に準じ、交配したダイコンF1世代を自家受粉して得られる数千個のF2集団を用いることができる。これらを解析することにより、Rf遺伝子を挟むような形で、両側にそれぞれ0.2cM程度の遺伝距離で離れた位置に連鎖するDNAマーカーを単離することができ、これにより図1に

示すようなマーカーとR<sub>f</sub>遺伝子の遺伝距離を示したゲノムの地図を作成することができる。

### 【0031】

ゲノムの地図作成に続いては、その位置に対応するゲノムDNAをクローニングし、目的の遺伝子を挟むDNAマーカー間を繋ぐことが必要になる。通常はDNAマーカーと目的遺伝子との物理距離が離れているため、ゲノムDNA断片を持つクローニングを複数個繋げることによって、DNAマーカーから目的遺伝子領域をカバーすることになる。このDNAマーカー間を、ゲノムDNA断片を持つクローニングで繋ぐ行程がコンティグの作製である。R<sub>f</sub>遺伝子の場合も同様に、よりR<sub>f</sub>遺伝子に近い位置に存在するDNAマーカー間を、R<sub>f</sub>遺伝子領域をカバーするように、ゲノムDNA断片を持つクローニングを複数個繋ぐことによってコンティグを作製することができる。

### 【0032】

ゲノムDNA断片をもつクローニングの集合体はゲノミックライブラリーを作製することで得られる。通常は、クローニングできるゲノムDNAの長さによって、いくつかの種類のベクターが使用され、例えば、約20kbまでの断片をクローニングできるラムダファージベクター、比較的長い断片（～40kb）がクローニングできるコスミドベクター、より長い100kb以上の断片をクローニングできるBAC (Bacterial artificial chromosome) ベクター等を利用したライブラリーが挙げられる。

### 【0033】

いずれのライブラリーも、クローニングされた断片の平均長にライブラリーの集団数を乗じた値が、ライブラリーに供与されたゲノムの全長（ゲノムサイズ）に対して4から5倍程度の値に成ることが重要である。ダイコンのゲノムサイズは約500Mb<sub>p</sub>と考えられているので、ラムダファージベクターで平均長20kbの場合、集団数は $1.0 \times 10^5$ 個から $1.25 \times 10^5$ 個となり、コスミドライブラリーで平均長が40kbの場合は、集団数は $5.0 \times 10^4$ 個から $6.25 \times 10^4$ 個となる。ナタネのゲノムサイズは約1000Mb<sub>p</sub>と考えられているので、ラムダファージベクターで平均長20kbの場合、集団数は $2.0 \times$

10<sup>5</sup>個から2.5×10<sup>5</sup>個となり、コスミドライブラリーで平均長が40kbの場合は、集団数は1.0×10<sup>5</sup>個から1.25×10<sup>5</sup>個となる。

#### 【0034】

ライブラリーに供与するゲノムDNAは、目的の遺伝子を含む生物からゲノムDNAを常法により抽出すればよい。R<sub>f</sub>遺伝子の場合、R<sub>f</sub>系統であるダイコンの品種、近縁種を含むRaphanus属の植物、より具体的には細胞質雄性不穏回復系統のコセナダイコン、オグラダイコン、園紅ダイコン、又は、これらのダイコンの品種や近縁種を含むRaphanus属植物の細胞質雄性不穏回復遺伝子を含んだゲノムDNAが交配や細胞融合の手法により移入されたプラシカ属の植物、より具体的にはR<sub>f</sub>ナタネが利用できる。一般的には、F<sub>2</sub>集団やB<sub>C</sub><sub>1</sub>集団を作製した時に利用した親と同じR<sub>f</sub>系統の植物からゲノムDNAを抽出し、ゲノミックライブラリーを作製することが最も望ましいと考えられる。ゲノムDNAはCTAB法 (Murray, M. G. and Thompson, W. F. (1980) Nucleic Acids Res., 8, 4321) のような常法に従い、調製することができる。

#### 【0035】

コンティグの作製は最初に、R<sub>f</sub>遺伝子の両側に位置するDNAマーカーを保持するクローンを単離する。ゲノミックライブラリーから、常法により、ラムダファージライブラリーの場合は、プラーカハイブリダイエーション法を用いて、コスミドライブラリーとBACライブラリーの場合はコロニーハイブリダイゼーション法を用いて単離する。次にその単離したクローンの末端領域を指標にして、そのクローンに隣接するクローンを単離する事によってコンティグを作製する。作成後、コンティグの塩基配列を、常法により決定する。

#### 【0036】

近年のゲノムプロジェクトの進展から、ゲノムDNAの塩基配列から機能する遺伝子を推定する技術が発達してきた。「Genscan」に代表される遺伝子発見プログラムは、かなりの確度で遺伝子を推定することができる。また「BLAST」に代表されるホモロジー検索プログラムは、他の遺伝子やタンパク質の類似性を推定することができる。この様な解析ソフトウェアを利用して、目的の遺伝子を推定し、単離することが行われている。R<sub>f</sub>遺伝子の場合も、同様にコンティグ

のゲノムDNA配列を同様の解析ソフトウェアを用いることにより単離、同定することが可能だと考えられる。また解析すると、ゲノムDNA塩基配列上のプロモーター部分、イントロンを含んだ構造遺伝子部分、ターミネーター部分が明示される。また同時に、イントロンを含んだ構造遺伝子に対して、イントロンが除かれたタンパク質に翻訳される形の遺伝子とその遺伝子に対するアミノ酸配列が明示される。この様にしてコンティグ上のRf遺伝子をかなりの確度で推定することが可能である。

#### 【0037】

この様にして得られるプロモーター部分とイントロンを含んだ構造遺伝子部分とターミネーター部分は、上述のゲノムの地図とDNAマーカーの関係やDNAマーカーとコンティグの関係に基づいた存在位置からRf遺伝子その物かどうかの確認ができる。

#### 【0038】

上述の手法で推定されるタンパク質に翻訳される形の遺伝子としては、具体的には、配列番号2で示されるDNAが挙げられ、該DNA配列をもとに、一般的な遺伝子工学的手法によってcDNAを単離することも可能である。

#### 【0039】

具体的には、本発明の遺伝子が発現される適当な植物起源、具体的には、ダイコンの品種、近縁種を含むRaphanus属の植物、より具体的にはコセナダイコン、オグラダイコン、紅園ダイコン、又は、これらのダイコンの品種や近縁種を含むRaphanus属の植物のゲノムDNAが交配や細胞融合の手法により移入されたブラシカ属の植物、より具体的にはRfナタネより、常法に従ってcDNAライブラリーを調製し、該ライブラリーから、本発明の遺伝子に特有の適当なDNA断片をプローブとして、又は本発明の遺伝子の翻訳産物に対する抗体を用いて所望のクローンを選抜することにより、本発明の遺伝子に相当するcDNAを単離することができる。

#### 【0040】

上記において、cDNAの起源としては、本発明の遺伝子を発現する各種の細胞、組織やこれらに由来する培養細胞が例示される。また、これらからの全RN

Aの分離、mRNAの分離や精製、cDNAの取得とそのクローニングなどはいずれも常法に従って実施することができる。

本発明の遺伝子をcDNAライブラリーからスクリーニングする方法も、特に制限されず、通常の方法に従うことができる。

#### 【0041】

ここで用いられるプローブとしては、本発明の遺伝子の塩基配列に関する情報をもとにして化学合成されたDNAなどが一般的に使用できるが、すでに取得された本発明の遺伝子やその断片も良好に使用できる。また、本発明の遺伝子の塩基配列情報に基づき設定したセンスプライマー、アンチセンスプライマーをスクリーニング用プローブとして用いることもできる。

#### 【0042】

前記プローブとして用いられるセンスプライマーとアンチセンスプライマーのヌクレオチド配列は、配列番号3で示されるアミノ酸配列をコードするDNAに対応する部分ヌクレオチド配列であって、少なくとも15個以上の連続した塩基、好ましくは20個以上の連続した塩基、より好ましくは30個以上の連続した塩基、もっとも好ましくは50個以上の連続した塩基を有するものが挙げられる。あるいは前記配列を有する陽性クローンそれ自体をプローブとして用いることもできる。

#### 【0043】

本発明の遺伝子の取得に際しては、PCR法によるDNA/RNA增幅法や5'-RACE法等に代表されるRACE法等、遺伝子の単離に通常用いられる手法を組み合わせて行えばよい。

#### 【0044】

かかるPCR法の採用に際して使用されるプライマーは、本発明によって明らかにされた本発明の遺伝子の配列情報に基づいて適時設定でき、これは常法に従って合成できる。なお、増幅させたDNA/RNA断片の単離精製は、前記の通り常法に従うことができ、例えばゲル電気泳動法などで行うことができる。

#### 【0045】

また、上記で得られる本発明の遺伝子あるいは各種DNA断片は、常法に従つ

て、その塩基配列を決定することができる。

このようにして得られる本発明の遺伝子によれば、例えば該遺伝子の一部または全部の塩基配列を利用することにより、個体もしくは各種組織における本発明遺伝子の存在と発現の有無を特徴的に検出することができる。

#### 【0046】

前述した通り、本発明の遺伝子としては、例えば配列番号3に示されるアミノ酸配列をコードするDNAを挙げることができるが、特にこれに限定されることなく、当該遺伝子の相同物も包含される。

ここで遺伝子の相同物とは、本発明遺伝子（またはその遺伝子産物）と配列相同意を有し、上記構造的特徴、および上記したようなその生物学的機能の類似性により一つの遺伝子ファミリーと認識される一連の関連遺伝子を意味し、該遺伝子の対立遺伝子も当然含まれる。

#### 【0047】

例えば、本発明の遺伝子は、配列番号1もしくは配列番号2で示される特定の塩基配列を有する遺伝子に限らず、配列番号3で示した各アミノ酸残基に対する任意のコドンを組み合わせて選択した塩基配列を有することも可能である。コドンの選択は、常法に従うことができ、例えば利用する宿主のコドン使用頻度などを考慮することができる。

#### 【0048】

また、前記の通り、本発明の遺伝子は、配列番号1又は配列番号2に示される塩基配列を有するDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAをも包含する。このようなDNAは、配列番号1又は配列番号2に示される塩基配列を有するDNAと一定以上の相同性を有するDNAである。

#### 【0049】

上記した一定以上の相同性を有するDNAとは、配列番号1又は2で示される塩基配列あるいは配列番号3で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列と少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%、さらにもっとも好ましくは少なくとも97%の同一性を有するポリヌクレオチドおよびその相補鎖ポリヌクレオチドを言う。

## 【0050】

より具体的には、例えば、0.1% SDSを含む0.2×SSC中50℃または0.1% SDSを含む1×SSC中60℃のストリンジエントな条件下で、配列番号1もしくは配列番号2に示される塩基配列のDNAとハイブリダイズする塩基配列を有するDNAを例示することができる。

## 【0051】

また、本発明のDNAのうち、特に

配列番号1に記載の塩基配列において1から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA；

配列番号2に記載の塩基配列において1から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA；及び

配列番号3に記載のアミノ酸配列において1から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質をコードするDNA：

については、化学合成、遺伝子工学的手法、突然変異誘発などの当業者に既知の任意の方法で作製することができる。例えば、配列番号1又は2に記載の塩基配列を有するDNAを利用し、これらDNAに変異を導入することにより変異遺伝子を取得することができる。

## 【0052】

変異遺伝子を得るための方法として、例えばランダム突然変異体、標的のある突然変異体、合成遺伝子を用いた方法など（新遺伝子工学ハンドブック、実験医学 別冊、羊土社、1996参照）等の公知の方法を用いることができる。

具体的には、配列番号1又は2の塩基配列を有するDNAに対し、変異原となる薬剤と接触作用させる方法、紫外線を照射する方法、遺伝子工学的手法等を用いて行うことができる。遺伝子工学的手法の一つである部位特異的変異誘発法は特定の位置に特定の変異を導入できる手法であることから有用であり、モレキュラークローニング第2版等に記載の方法に準じて行うことができる。

## 【0053】

(3) 本発明のDNAを含有するベクター

本発明のDNAは適当なベクター中に組み込んで組み換えベクターとして使用することができる。ベクターの種類は発現ベクターでも非発現ベクターでもよく、目的に応じて選ぶことができる。

クローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自律複製できるものが好ましく、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる、大腸菌の発現用ベクターをクローニングベクターとして用いてもよい。具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript I I SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494(1989)]、Lambda ZAP II(ストラタジーン社製)、 $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49(1985)]、 $\lambda$ TriplEx(クローンテック社製)、 $\lambda$ ExCell(ファルマシア社製)、pT7T318U(ファルマシア社製)、pcD2 [Mol. Cen. Biol., 3, 280 (1983)]、pMW218(和光純薬社製)、pUC118(宝酒造社製)、pEG400 [J. Bac., 172, 2392 (1990)]、pQE-30 (QIAGEN社製)等をあげることができる。

## 【0054】

発現ベクターは宿主との組み合わせを考えて選択することができ、好ましくは宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込みが可能で、本発明の遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌を宿主細胞として用いる場合は、DNAを発現させるための発現ベクターは該細菌中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、上記DNAおよび転写終結配列より構成された組換えベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

## 【0055】

細菌用の発現ベクターとしては、例えば、pBTrP2、pBTac1、pBTac2(いずれもベーリンガーマンハイム社より市販)、pKK233-2(Pharmacia社製)、pSE280(Invitrogen社製)、pGEMEX-1(Promega社製)、pQE-8(QIAGEN社製)、pQE-30(QIAGEN社製)、pKYP10(特開昭58-110600)、pKYP200 [Agrc. Biol. Chem., 48, 669(1984)]、PLSA1 [Agrc. Biol. Chem., 53, 277(1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. U

SA, 82, 4306 (1985)】、pBluescriptII SK+、pBluescriptII SK(-) (Stratagene社製)、pTrS30 (FERMBP-5407)、pTrS32 (FERM BP-5408)、pGEX (Pharmacia社製)、pET-3 (Novagen社製)、pTerm2 (US4686191、US4939094、US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pUC18 [Gene, 33, 103(1985)]、pUC19 [Gene, 33, 103(1985)]、pSTV28 (宝酒造社製)、pSTV29 (宝酒造社製)、pUC118 (宝酒造社製)、pPA1 (特開昭63-233798)、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392(1990)]、pQE-30 (QIAGEN社製)等を例示することができる。細菌用のプロモーターとしては、例えば、trpプロモーター (P<sub>trp</sub>)、lacプロモーター (P<sub>lac</sub>)、P<sub>L</sub>プロモーター、P<sub>R</sub>プロモーター、P<sub>SE</sub>プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーター等を挙げることができる。

#### 【0056】

酵母用の発現ベクターとして、例えば、YEpl3 (ATCC37115)、YEpl24 (ATCC37051)、Ycp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を例示することができる。酵母用のプロモーターとしては、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gallプロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF<sub>α</sub>1プロモーター、CUP1プロモーター等のプロモーターを挙げることができる。

#### 【0057】

動物細胞用の発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8 (フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平3-22979; Cytotechnology, 3, 133, (1990)]、pAS3-3 (特開平2-227075)、pCDM8 [Nature, 329, 840, (1987)]、pcDNA1/AmP (Invitrogen社製)、pREP4 (Invitrogen社製)、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307(1987)]、pAGE210等を例示することができる。動物細胞用のプロモーターとしては、例えば、サイトメガロウイルス(ヒトCMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR<sub>α</sub>プロモーター等を挙げることができる。

#### 【0058】

植物細胞用の発現ベクターとしては、例えば、pIG121-Hm [Plant Cell Report, 15, 809-814(1995)]、pBI121 [EMBO J. 6, 3901-3907(1987)] 等を例示することができ、植物細胞用のプロモーターとしては、例えば、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター [Mol. Gen. Genet. (1990) 220, 389-392] 等が挙げられる。なお、植物の形質転換についての詳細は別途後述する。

#### 【0059】

##### (4) 本発明のDNAを有する形質転換体

本発明のDNAを有する形質転換体は、上記した組み換えベクター（好ましくは発現ベクター）を宿主に導入することにより作製することができる。

細菌の宿主細胞の具体例としては、Escherichia属、Corynebacterium属、Brevibacterium属、Bacillus属、Microbacterium属、Serratia属、Pseudomonas属、Acrobacterium属、Alicyclobacillus属、Anabaena属、Anacystis属、Arthrobacter属、Azobacter属、Chromatium属、Erwinia属、Methylobacterium属、Phormidium属、Rhodobacter属、Rhodopseudomonas属、Rhodospirillum属、Scenedesmus属、Streptomyces属、Synnecoccus属、Zymomonas属等に属する微生物をあげることができる。細菌宿主へ組換えベクターを導入する方法としては、例えば、カルシウムイオンを用いる方法やプロトプラスト法等を挙げることができる。

#### 【0060】

酵母宿主の具体例としては、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe)、クリュイベロミセス・ラクチス (Kluyveromyces lactis)、トリコスporon・プルランス (Trichosporon pullulans)、シュワニオミセス・アルビウス (Schwanniomyces alluvius) 等を挙げることができる。

酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。

#### 【0061】

動物細胞宿主としては、ナマルバ細胞、COS1細胞、COS7細胞、CHO細胞等を挙げることができる。

動物細胞への組み換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入できるいかなる方法も用いることができ、例えば、エレクトロポーレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。植物細胞を用いた形質転換体については後述する。

#### 【0062】

##### (5) 本発明のタンパク質の產生

本発明は、下記の何れかのタンパク質に関する。

- (1) 配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；又は
- (2) 配列番号3に記載のアミノ酸配列において1から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質；

#### 【0063】

本発明のタンパク質は、例えば、本発明の遺伝子を有する形質転換体を培養し、培養物中に本発明のタンパク質を生成蓄積させ、該培養物より該タンパク質を採取することにより取得することができる。

#### 【0064】

本発明の遺伝子を有する形質転換体を培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

本発明の形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、これら微生物を培養する培地は、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好気的条件下で行なうことが好ましく、培養温度は通常15～40℃であり、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。また培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

#### 【0065】

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般

に使用されているRPM11640培地 [The JouRNAL of the American Medical Association, 199, 519(1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501(1952)]、DME M培地 [Virology, 8, 396(1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1(1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常 pH 6～8、30～40℃、5% CO<sub>2</sub>存在下等の条件下で1～7日間行う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

#### 【0066】

植物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、MS 培地、R2P 培地等、その植物種に応じて通常用いられる培地が用いられる。培養は、通常 pH 6～8、15～35℃等の条件下で1～21日間行う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

#### 【0067】

形質転換体の培養物から、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する本発明のタンパク質を単離精製するには、通常のタンパク質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明のタンパク質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常のタンパク質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)セファロース、DIAION HPA-75(三菱化成社製)等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティーコロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる

## 【0068】

また、該タンパク質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該タンパク質を回収後、該タンパク質の不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶化液を、タンパク質変性剤を含まないあるいはタンパク質変性剤の濃度がタンパク質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該タンパク質を正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

## 【0069】

本発明のタンパク質あるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該タンパク質あるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

## 【0070】

また、本発明のタンパク質は、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法によっても製造することができる。また、桑和貿易(米国Advanced Chem Tech社製)、パーキンエルマージャパン(米国Perkin-Elmer社製)、ファルマシアバイオテク(スウェーデンPharmacia Biotech社製)、アロカ(米国Protein Technology Instrument社製)、グラボウ(米国Synthecell-Vega社製)、日本パーセプティブ・リミテッド(米国Per Septive社製)、島津製作所等のペプチド合成機を利用し合成することもできる。

## 【0071】

(6) 本発明のDNAを有する植物の形質転換体

配列番号1に記載された塩基配列は、植物ゲノム本来の塩基配列を抜き出した形の塩基配列である。この塩基配列は、遺伝子の発現に必要なプロモーターとターミネーターを作動可能な形で含んでいる。導入するベクターは、直接導入法の場合は一般的なクローニングベクター、たとえばコスミドpWE15(STRATAGENE社

製) などに当該遺伝子をクローニングすることができる。アグロバクテリウムを利用する場合は、一般的な植物形質転換用ベクター、たとえばpBI121 (Clontec 社製) などにクローニングすることができる。

#### 【0072】

また、この配列から一部のイントロンを抜き出した塩基配列のDNAや、ほとんどすべてのイントロンを抜き出した塩基配列のDNA、又は配列番号2で示されるDNA、配列番号3で示されるタンパク質をコードするDNAを植物細胞に導入してもよい。

#### 【0073】

さらに、プロモーターとターミネーター部分を既知の植物細胞中で機能するプロモーターとターミネーターと置換してもよい。

尚、上記配列番号2で示されるDNAや配列番号3で示されるタンパク質をコードするDNAを植物細胞に導入する場合には、このDNAの他にプロモーターとターミネーターが必要である。通常よく使用される一般的な発現ベクターとしては、pBI121(clonetec社製)が挙げられるが、このベクターはプロモーターにカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター、ターミネーターにA. tumefaciensのTiプラスミドに存在するノパリン合成酵素のターミネーターが使用されている。また発現に必要なプロモーターとしては、上記カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターに限らずに、植物に広く存在するrbcSプロモーター等を用いてもよく、より好ましくは花粉の生育期に発現する種類のプロモーター例えはTA29プロモーターが、さらに好ましくは当該遺伝子の上流に配位された本来のプロモーターが用いられる。ターミネーターについても、上記ノパリン合成酵素のターミネーターに限らず、カリフラワーモザイクウイルスの35Sターミネーター等を用いることができ、より好ましくは当該遺伝子の下流に配位された本来のターミネーターが用いられる。

#### 【0074】

本発明者らは以下の実施例において、配列番号1に示された、ゲノムに存在する本来のプロモーターからターミネーターまでに含まれるイントロンを含んだRf遺伝子のDNAを、本来の形で植物に導入するために、植物形質転換用ベクタ

ーを作製した。コンティグの一部であるTo3-2クローンから配列番号1に示された塩基配列を制限酵素によって切り出した後、適当なクローニングベクターにサブクローンした後、植物形質転換用ベクターpKM424にサブクローニングした断片を導入し、当該断片を植物に導入可能なベクターを得た。このベクターを植物形質転換用アグロバクテリウム細菌に導入した。このベクターを保持したアグロバクテリウム細菌を植物に感染させることによって当該DNA断片が植物ゲノム中に組み込まれる。

#### 【0075】

本発明の遺伝子が適用される植物は、例えばナタネ、ヒマワリ、ダイズ、パーム椰子等の油量作物、例えばイネ、トウモロコシ、コムギ等の禾穀類、例えば、タバコ、ペチュニア等の花卉類、例えばトマト、ブロッコリー、キャベツ、白菜、人参等の各種の野菜類などが例示される。

このうち、ナタネ、キャベツ、白菜、ブロッコリー等のブラシカ属の植物やトマトなどが好ましく、特に好ましくは、ナタネ、キャベツ、白菜、ブロッコリーが挙げられ、最も好ましくは、ナタネである。

#### 【0076】

本明細書において、形質転換植物源としては、種子、芽生え、苗、カルス、培養細胞、植物体などが挙げられ、例えば、ナタネの場合には芽生えまたはプロトプラスト；ダイズの場合には芽生え、カルスまたは培養細胞；ヒマワリの場合には芽生え；パーム椰子の場合にはカルスまたは培養細胞；イネの場合には、芽生え、カルス、培養細胞またはプロトプラスト；トウモロコシには、芽生え、苗、カルス、培養細胞またはプロトプラスト；コムギの場合には、芽生え、カルスまたは培養細胞；キャベツ、ブロッコリーの場合には、芽生え、カルス、培養細胞またはプロトプラスト；ニンジンの場合には、芽生え、カルス、培養細胞またはプロトプラスト等と言ったように、当業者が通常行うように、対象植物によって適宜好ましい部位を選択して行えばよい。

#### 【0077】

植物への形質転換法は常法に従って行うことができ、例えば、ベクターを一度アグロバクテリウムに導入した後に、アグロバクテリウムを植物細胞に感染させ

ることで、ベクターを植物に導入する方法や、エレクトロポーレイション法、D E A E デキストラン法、リン酸カルシウム法、ポリエチレングリコール法、ペティクルガン法などを用いてベクターを細胞へ直接導入する方法等を挙げることができる。

### 【0078】

例えば、ナタネの場合に好ましい遺伝子導入法としては、下記に記載された方法が挙げられる。

スクロース等の糖類を炭素源として含んだ MS培地で無菌発芽させたナタネ品種の下胚軸を 2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸、及びスクロースを含む B 5 培地上で前培養する。YEB 培地で増殖させたアグロバクテリウムを遠心により集菌し、スクロースを含んだ MS 培地に再懸濁を行う。この懸濁液に、先のナタネ下胚軸を加え振とうさせた後、取り出した下胚軸を元の前培養培地に戻し 3 日間共存培養した後、ゼアチン、ベンジルアミノプリン等の植物ホルモン、カルベニシリン、及びカナマイシンを含む選択培地に移して選抜を行う。これにより、得られた緑色の再生芽を、ベンジルアミノプリン等の植物ホルモンを任意に含んだ伸長培地、引き続いてナフタレン酢酸、ベンジルアミノプリン等の植物ホルモンを任意に含んだ発根培地で培養することで再生個体を得ることができ、この個体を c m s 系統の個体と交配することにより、稔性が回復された F 1 雜種を得ることができる。

### 【0079】

このように植物に本発明の D N A を導入することにより、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することが可能になる。

尚、上記再生個体は、c m s 系統のナタネと交配し、その子孫の稔性を調査することで、発現の確認ができるが、c m s 細胞質を持つナタネを原料として形質転換を行った場合には、上記のように根を形成した形質転換体（再生個体）を通常の肥料を含む土壤に移し開花させることで、稔性を調査でき、時間的にも操作的にも簡便で好ましい。

また、上記形質転換において、用いる細胞として c m s 細胞質を有するナタネの細胞又は組織、好ましくは胚軸、子葉、葉、花粉、培養細胞、カルス、プロト

プラスチを利用して上述のように形質転換を行った場合には、上記の方法で得られる植物体（再生個体）を通常の肥料を含む土壤に移し開花させることで、稔性が回復された植物個体を得ることができる。

すなわち、c<sub>m</sub>s細胞を用い、該c<sub>m</sub>s細胞に上述の遺伝子導入法で本発明のDNAを導入し、該DNAが核に組み込まれている細胞をカナマイシン等の抗生物質耐性あるいは除草剤耐性選抜マーカーを指標にして選抜した後、前述のような伸長培地及び発根培地で培養することにより該DNAが核に組み込まれた植物体を得ることができる。この植物体は、不稔形質が回復され可稔となる。

さらに、c<sub>m</sub>s細胞質を有し、かつ、本発明のDNAを有する細胞に、さらに誘導型プロモーターと共に本発明の遺伝子の一部又は全部を導入することで、本発明のDNAの発現を特異的にしかも一時的に制御することで、ハイブリッド種子生産に必要な雄性不稔性維持系統（維持系統）を必要としない新しいハイブリッド種子生産システムを作ることができる。

すなわち、通常、c<sub>m</sub>s系統のナタネは不稔であるため、c<sub>m</sub>s系統を増殖、維持するためには、別途、c<sub>m</sub>s及びR<sub>f</sub>が関与していない維持系統というものが必要であり、従来、ハイブリッド種子の生産のためにはR<sub>f</sub>系統、c<sub>m</sub>s系統、維持系統という3つの系統の植物を必要としたが、本発明により、R<sub>f</sub>遺伝子が単離・同定されたため、ハイブリッド生産の際に、化学物質によるプロモーターの誘導を行い、回復遺伝子の発現を制御すると言う方法を用いることにより、維持系統が無くとも増殖、維持が可能となるc<sub>m</sub>s系統が構築できる。

具体的には、外部から誘導するプロモーター、例えば、薬剤感受性のあるプロモーターを有するベクターに、本発明の遺伝子の一部または全長をアンチセンスあるいはセンスの向きで組み込み、該ベクターを用いて、c<sub>m</sub>s細胞質を有し、かつ、本発明のDNAを有する細胞を形質転換する。

c<sub>m</sub>s細胞質を有し、かつ、本発明のDNAを有する細胞としては、上述の方法に従い、c<sub>m</sub>s細胞質を有する細胞を本発明のDNAで形質転換したものだけでなく、c<sub>m</sub>s系統とR<sub>f</sub>系等を交配して得られたものでもよい。

上述の誘導可能なプロモーターとしては、例えば、特開平6-46697で知られており、ベクターの作成及び形質転換の方法としては上述と同様の手法が挙

げられる。

上記方法により得られるc m s細胞質を有し、かつ、本発明のDNAを有する細胞であって、さらに誘導型プロモーターと共に本発明のDNAの一部又は全部が組み込まれた形質転換体は、通常、プロモーターが誘導されていないため、元々存在するR f遺伝子により植物は可稔性を示し、該系統の維持も自家受粉により行うことができるが、ハイブリッド生産の際には、この植物にプロモーターを誘導させる能力を有する化学物質を作用させ、プロモーターが誘導されることによりR f遺伝子の発現が阻害される。これにより、その植物は雄性不稔となるため、ハイブリッド種子生産時にc m s系統として使用することができる。

従って、この方法を用いることで、c m s系統であっても増殖、維持が自家受粉で行えることになるので、従来はハイブリッド種子の生産のために3つの系統が必要であったものが、維持系統は必要なくなり、生産コストを大幅に減少させることが可能になる。

以下、実施例について更に詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によつて何ら限定されるものではない。

#### 【0080】

##### 【実施例】

実施例1：細胞質雄性不稔回復遺伝子に連鎖するDNAマーカーの単離とゲノム地図の作製

稔性回復遺伝子（R f遺伝子）を単離するために、まず、R f遺伝子の近傍に位置するDNAマーカーを単離し、このDNAマーカーとR f遺伝子の遺伝距離の関係を示したゲノムの地図を作製する必要がある。その出発点としてR f領域のポジショナルクローニングを行った。

#### 【0081】

DNAマーカー単離法には、AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 法(Nucleic Acids Research, 1995, Vol.23, No.21 4407-4414)に準じた、GIBCO BRL社のAFLP Analysis System I A FLP Starter Primer Kitに従ってAFLPを行った。マーカーとの遺伝距離を測定する材料として、c m s系統コセナダイコン(Raphanus

*s sativus* cv. Koseno)の1個体((KC2/KA1)-1)とRf系統である園紅ダイコン(*Raphanus sativus* cv. Yuanhong)の1個体(Yuan10-3)とをN. Koizuka, et al. Theor Appl Genet, 100:949-955 2000に記載の方法に準じ、交配したダイコンF1世代8個体を自家受粉して得られた約2100個体のF2集団を用いた。その結果、Rf遺伝子を挟むような形で、両側にそれぞれ0.2cM程度の遺伝距離で離れた位置に連鎖するマーカーを5つ単離した。各DNAマーカーとRf遺伝子の遺伝的距離を示したゲノムの地図を図1に示す。

### 【0082】

実施例2：ゲノム地図を基にしたコンティグの作製とRf遺伝子の解析

ゲノム地図作成に続いてはその位置に対応するゲノムDNAをクローン化し、Rf遺伝子を挟むDNAマーカー間を繋ぐ事が必要になる。ここで、DNAマーカーとRf遺伝子との距離が離れているため、ゲノムDNA断片を持つクローンを複数個繋げる事によって、DNAマーカーからRf遺伝子領域をカバーするコンティグを作製した。

### 【0083】

ゲノムDNA断片をもつクローンの集合体をゲノミックライブラリーといい、我々は2種類のライブラリーを作製した。DNA供与体として、F2集団を作製した時に利用した親と同じ園紅ダイコンより、常法に従い、CTAB法(Murray, M. G. and Thompson, W. F. (1980) Nucleic Acids Res., 8, 4321)によりゲノムDNAを調製した。ライブラリーは、ラムダベクターとしてλDASHIIベクター(STRATAGENE社製)を用いて、平均長20kb、集団数 $1.5 \times 10^5$ 個のラムダファージライブラリーを作製した。また、コスミドベクターとしてpWEB::TNCベクター(EPIC ENTRE TECHNOLOGIES社製)を用いて、平均長40kb、集団数 $5.5 \times 10^4$ 個のコスミドライブラリーを作製した。

### 【0084】

コンティグの作製は最初に、Rf遺伝子の両側に位置するDNAマーカーを指標に、上記で作製したラムダファージライブラリーから、プラーカハイブリダイエーション法を用いて、ラムダクローンを単離した。またコスミドライブラリーから、コロニーハイブリダイゼーション法を用いてコスミドクローンを単離し、

図1に示すような両端のDNAマーカー間をカーバーするコンティグを完成した。コンティグの一部を成すコスミドクローンNIT7/2とT03-2は常法により、塩基配列を決定した。

#### 【0085】

続いて、上記コンティグの一部を成すコスミドクローンNIT7/2とT03-2の塩基配列を、「Genscan」（三菱スペースソフトウェア社製）を用いて、ダイコンとゲノムDNA配列が似通っており、最近全ゲノム配列が決定されたシロイヌナズナに対するパラメーターを加味して解析した。その結果、R<sub>f</sub>遺伝子を発現すると思われるプロモーター部分とイントロンを含んだ構造遺伝子部分とターミネーター部分を発見した。さらに、イントロンが除かれたタンパク質に翻訳される形の遺伝子とその遺伝子に対するアミノ酸配列を得た。この様に得られたプロモーター部分とイントロンを含んだ構造遺伝子部分とターミネーター部分は、上述のゲノムの地図とDNAマーカーの関係やDNAマーカーとコンティグの関係から、その存在する位置的に考えて、R<sub>f</sub>遺伝子その物だと言える。

#### 【0086】

##### 実施例3：ゲノミックDNA領域のサブクローニング

「Genscan」で推定されたプロモーターからターミネーターを十分に含む、配列番号1に記載された1から8553塩基までのHpaI-SwaI断片(8553bp)を、フラグメント回収用アガロース(FMC社製)を用いたゲル電気泳動によりベクターと分離した。DNA断片を含むゲルをゲル分解酵素(Epicentre Technologies社製)により消化してDNAを回収した。Taq DNA polymerase(宝酒造社製)を用いて3'末端にdAを付加し、pGEM-T easyベクター(Promega社製)にサブクローニングして、cds6/pGEM-Teasyを得た。以下、詳細に記述する。

#### 【0087】

100μlの1×K制限酵素緩衝液(20mM Tris-HCl(pH8.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol, 100mM KCl)中に、1μgのNIT7/2コスミドDNAと10 unitの制限酵素HpaI(宝酒造社製)を加え、37℃にて1時間加温した。

#### 【0088】

加温後、10μlの3M酢酸ナトリウム(pH5.6)と250μlのエタノールを加えて攪拌

後、-80°Cにて5分間冷却して、15000rpm、4°Cで15分間遠心する。上精を除き、さらに1mlの70%エタノールを静かに加え、15000rpm、4°Cで5分間遠心する。上精を除き、遠心真空乾燥機を用いて、沈殿を5分間乾燥させる。回収したDNA沈殿に、滅菌水89μlを加えて溶かす。

#### 【0089】

溶かしたDNA溶液に、10μlの10×H制限酵素緩衝液(500mM Tris-HCl(pH7.5), 100mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Dithiothreitol, 1000mM NaCl)、1μlの10unit/μl制限酵素SwaI(宝酒造社製)を加え、25°Cにて1時間加温した。11μlの10×loading緩衝液(1% SDS, 50% Glycetrol, 0.05% Bromophenol Blue)を加えた。

#### 【0090】

1.2gの低融点アガロースSeaPlaqueGTG agarose(FMC社製)と、150mlの1×TAE(40mM Tris-acetate, 1mM EDTA)緩衝液を混和後、100°Cに加熱してアガロースを溶かし、45°Cまで攪拌しながら冷却した。14×15cmのゲルトレイに30mm幅×1mm厚のコームを設置し、冷却したゲルを流し込み固めた。ゲルコームにloading Dyeを加えたDNAを流し込み、1×TAE、30V/30cmの電圧で18時間電気泳動した。

#### 【0091】

電気泳動したゲルを、0.5μg/mlエチジウムプロミド/1×TAE溶液に移し、30分染色した。ゲルを365nmの長波紫外線を放射したトランスイルミネーターの上に乗せ、目的の4126bpの断片を、滅菌したメスを用いて切り出した。さらにゲルを約1mm角の断片になるように刻み、あらかじめ秤量した2mlのマイクロチューブに移し、ゲルの重さを秤量した。

#### 【0092】

ゲルの重さ50mgに対して1μlの50×GELase Buffer(2M Bis-Tris(pH6.0), 2M NaCl)を加えた。ゲルの入ったチューブを68°Cに加温したドライヒートブロックに入れ、時々チューブを上下にしながら攪拌し、10分間加温して、ゲルを完全に溶かした。このチューブを45°Cのドライヒートブロックに移し、時々チューブを上下にしながら攪拌し、5分間加温した。このチューブに、ゲルの重さ200mgに対して1unitのGELase(Epicentre Technologies社製)を加えて45°Cのドライヒートブロックで、時々チューブを上下にしながら攪拌し、30分間加温した。

**【0093】**

ゲル容積に対して、1/3容量の10M 酢酸アンモニウム(pH7.0)を加え攪拌し、15000rpm、5分間遠心した。上精を新しい2mlのマイクロチューブに移し、上精に対して2容量のエタノールを加えた。チューブを攪拌後、15000rpm、4℃で20分間遠心した。上精を除き、さらに1mlの70%エタノールを静かに加え、15000rpm、4℃で5分間遠心した。上精を除き、遠心真空乾燥機を用いて、沈殿を5分間乾燥させた。沈殿に20μl のTE緩衝液(10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA)を加え、完全に溶かした。

**【0094】**

回収した20μlのDNA溶液に、55μlの滅菌水、10μlの10x PCR 緩衝液(100mM Tris-HCl(pH8.3), 500mM KC1)、6μlの25mM MgCl<sub>2</sub>、8μlの2.5mM dNTP mix、1μlの5 unit/μl のrTaq DNA polymerase(宝酒造社製)を加えて混和後、72℃で30分間加温して、3'末端にdATPを付加した。

**【0095】**

限外ろ過フィルターユニット:Microcon-50(ミリポア社製)に、上記反応液を移し、5000rpm、4℃で20分間遠心した。トラップの水を捨て、再度100μlの滅菌水を加えて、5000rpm、4℃で20分間遠心した。フィルターユニットを取り外し、向きを逆さにして新しいマイクロチューブに装着した。3000rpm、4℃、5分間遠心して、フィルターユニットのDNAを回収した。

**【0096】**

5μlの精製されたクローニング断片、1μlの50ng/μl pGEM-T easyベクター(Promega社製)、6μlのDNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)のI溶液を混和後、16℃で30分間インキュベートした。

**【0097】**

限外ろ過フィルターユニット:Microcon-50(ミリポア社製)に、上記反応液を100μlの滅菌水とともに移し、5000rpm、4℃で20分間遠心した。トラップの水を捨て、再度100μlの滅菌水を加えて、5000rpm、4℃で20分間遠心した。フィルターユニットを取り外し、向きを逆さにして新しいマイクロチューブに装着した。3000rpm、4℃、5分間遠心して、フィルターユニットのDNAを回収した。

## 【0098】

回収したDNAをチューブごと氷上に立て冷却した。30μlのエレクトロポレーション用大腸菌DH10B (Gibco BRL社製)をチューブに入れ、軽く混ぜた。予め氷上で冷やしたエレクトロポレーション用(電極間隔1mm)キュベット(USA Scientific Plastics社製)に、DNAと混和した大腸菌を移した。Electro Cell Manipulator 600(BTX社製)を用いて、1.25kv、129Ω、50μFの条件でエレクトロポレーションを行い、その後直ちに37℃に温めた500μlのSOC培地(Gibco BRL社製)をキュベットに加えた。大腸菌を10mlの培養チューブに移し、37℃で1時間振とう培養した。100μg/mlのAmpicilin(和光純薬社製)、20μg/mlのX-Gal(宝酒造社製)、1mMのIPTG(宝酒造社製)を加えたLB寒天培地(1%Bacto-Tryptone, 0.5%Bacto-Yeast Extract, 1%NaCl, 1.5% Bacto-Agar)に、培養した大腸菌を拡げ、18時間以上37℃で培養した。

## 【0099】

寒天培地上に現れた白いコロニーを、100μg/mlのAmpicillinを加えた2mlのLB培地にて、37℃で18時間以上培養した。培養した大腸菌から、定法によりプラスミドDNAを抽出した。プラスミドDNAに目的の断片がクローニングされていることを制限酵素EcoRI(宝酒造社製)で切断して確認し、cds6/pGEM-T easyとした。

## 【0100】

cds6/pGEM-T easyを保持した大腸菌DH10Bを、100μg/mlのAmpicillinを加えた100mlのLB培地にて、37℃で18時間培養した。アルカリSDS法により、Qiagen Midiキット(キアゲン社製)を用いて精製した。

## 【0101】

## 実施例4：植物形質転換用ベクターの作製

cds6/pGEM-Teasyを制限酵素EcoRIで切断後、フラグメント回収用アガロースを用いたゲル電気泳動によりベクターと分離し、回収されたDNA断片を植物形質転換用ベクターpKM424のEcoRI部位にクローニングして、植物形質転換用ベクター-cds6/pKM424とした。以下に詳細を示す。

## 【0102】

100  $\mu$ lの1×H制限酵素緩衝液(50mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol, 100mM NaCl)中に、1  $\mu$ g のcds6/pGEM-T easy DNAと10 unitの制限酵素EcoRI (宝酒造社製)を加え、37°Cにて1時間加温した。

以下、上記のHpaI-SwaI断片を取り出した同様の方法で、cds6/pGEM-T easyからcds6を含むEcoRI断片を分離回収した。

#### 【0103】

100  $\mu$ lの1×H制限酵素緩衝液(50mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol, 100mM NaCl)中に、1  $\mu$ gの植物形質転換用ベクターpKM424と10 unitの制限酵素EcoRI (宝酒造社製)を加え、37°Cにて1時間加温した。加温後、100  $\mu$ l の1M Tris-HCl(pH8.0)と、1 unitのBacterial Alkaline Phosphatase(宝酒造社製)を加えて混和後、50°Cで1時間加温して脱リン酸化した。

#### 【0104】

200  $\mu$ lのTE緩衝液(10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA)で飽和したフェノール・クロロホルムを加え、激しく攪拌した。15000rpm、5分間遠心後、上精を新しいチューブに移す。同様の操作をもう一度繰り返し、タンパク質を取り除いた。20  $\mu$ lの3M酢酸ナトリウム(pH5.6)と500  $\mu$ lのエタノールを加えて攪拌後、-80°Cにて5分間冷却して、15000rpm、4°Cで15分間遠心した。上精を除き、さらに1mlの70%エタノールを静かに加え、15000rpm、4°Cで5分間遠心した。上精を除き、遠心真空乾燥機を用いて、沈殿を5分間乾燥させた。沈殿に100  $\mu$ lのTE緩衝液(10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA)を加え、完全に溶かし、10ng/ $\mu$ lの濃度とした。

#### 【0105】

10  $\mu$ lの精製されたEcoRI断片、1  $\mu$ lの脱リン酸化されたpKM424ベクター、11  $\mu$ l のDNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)I溶液を混和後、16°Cで30分間インキュベートした。

#### 【0106】

限外ろ過フィルターユニット:Microcon-50 (ミリポア社製) に、上記反応液を100  $\mu$ lの滅菌水とともに移し、5000rpm、4°Cで20分間遠心した。トラップの水を捨て、再度100  $\mu$ lの滅菌水を加えて、5000rpm、4°Cで20分間遠心した。フィルターユニットを取り外し、向きを逆さにして新しいマイクロチューブに装着した。

3000rpm、4℃、5分間遠心して、フィルターユニットのDNAを回収した。

#### 【0107】

回収したDNAをチューブごと氷上に立て冷却した。30μlのエレクトロポレーション用大腸菌DH10B (Gibco BRL社製)をチューブに入れ、軽く混ぜた。予め氷上で冷やしたエレクトロポレーション用(電極間隔1mm)キュベット(USA Scientific Plastics社製)に、DNAと混和した大腸菌を移した。Electro Cell Manipulator 600(BTX社製)を用いて、1.25kv、129Ω、50μFの条件でエレクトロポレーションを行い、その後直ちに37℃に温めた500μlのSOC培地(Gibco BRL社製)をキュベットに加えた。大腸菌を10mlの培養チューブに移し、37℃で1時間振とう培養した。50μg/mlのSpectinomycin(Sigma社製)を加えたLB寒天培地(1%Bacto-Tryptone, 0.5%Bacto-Yeast Extract, 1%NaCl, 1.5% Bacto-Agar)に、培養した大腸菌を拡げ、18時間以上37℃で培養した。

#### 【0108】

寒天培地上に現れたコロニーを、50μg/mlのSpectinomycinを加えた2mlのLB培地にて、37℃で18時間以上培養した。培養した大腸菌から、定法によりプラスミドDNAを抽出した。プラスミドDNAに目的の断片がクローニングされていることを制限酵素BamHI(宝酒造社製)で切断して確認し、cds6/pKM424とした。

cds6/pKM424を保持した大腸菌DH10Bを、50μg/mlのSpectinomycinを加えた250mlのLB培地にて、37℃で18時間培養した。アルカリSDS法により、Qiagen Midiキット(キアゲン社)を用いて精製した。

#### 【0109】

実施例5：アグロバクテリウムへの植物形質転換用ベクターの導入

アグロバクテリウムのコンピテントセルを調製し、得られたcds6/pKM424ベクターを、調製した植物形質転換用アグロバクテリウムEHA101に導入した。

#### 【0110】

アグロバクテリウムEHA101のエレクトロポレーション用コンピテントセルを以下の方法で作製した。アグロバクテリウムEHA101を、LB寒天培地上でストリーカして、28℃で24時間以上培養し、シングルコロニーを得た。20mlのLB培地の入った50ml遠心管に直径1mm程度のコロニーを植菌し、28℃で40時間振とう培養した

。40時間後、遠心管の蓋を一度開閉して、さらに4時間同様に培養した。培養液を1500×g, 4℃で遠心して集菌した。上精を捨てたチューブに40mlの氷冷した滅菌10%グリセロールを入れ、菌体を再懸濁し、1500×g, 4℃で遠心して集菌した。この操作を2回繰り返した。得られた菌体に氷冷した500μlの滅菌10%グリセロールを加え、再懸濁した。滅菌したマイクロチューブに100μlずつ菌体を分注し、液体窒素で凍結後、-80℃フリーザーに保存した。

### 【0111】

アグロバクテリウムEHA101のエレクトロポレーション用コンピテントセルを氷上で溶かした。予め冷やした1.5mlチューブに40μlのエレクトロコンピテントセルを入れ、100ngのcds6/pKM424のプラスミドDNAを加えて軽く混和した。予め氷上で冷やしたエレクトロポレーション用（電極間隔1mm）キュベット(USA Scientific Plastics社製)にDNAと混和したアグロバクテリウムを移す。Electro Cell Manipulator 600(BTX社製)を用いて、1.44kv、129Ω、50μFの条件でエレクトロポレーションを行い、その後直ちに30℃に温めた500μlのSOC培地(Gibco BRL社製)をキュベットに加えた。アグロバクテリウムを10mlの培養チューブに移し、30℃で1時間振とう培養する。50μg/ml Kanamycin(和光純薬社製), 25μg/ml Chloramphenicol(和光純薬社製), 50μg/ml Spectinomycin(Sigma社製), 2.5μg/ml Tetracycline(Sigma社製)を加えた2×LB寒天培地(2% Bacto-Tryptone, 1% Bacto-Yeast Extract, 1%NaCl, 1.5% Bacto-Agar)に、培養したアグロバクテリウムを拡げ、24時間以上30℃で培養した。

### 【0112】

寒天培地上に現れたコロニーを、50μg/mlのKanamycin, 25μg/mlのChloramphenicol, 50μg/mlのSpectinomycin, 2.5μg/mlのTetracyclineを加えた2mlのLB培地にて、30℃で24時間以上培養する。培養したアグロバクテリウムから、定法によりプラスミドDNAを抽出し、cds6/pKM424がアグロバクテリウムに導入されていることを制限酵素BamHI(宝酒造社製)で切断して確認した。確認されたクローンは、24時間培養した培養液に滅菌80%グリセロールを等量加えて混和後、-80℃に保存し、ナタネの形質転換に用いた。

### 【0113】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Mitsubishi Chemical Corporation

&lt;120&gt; A gene which is involved in recovery of cytoplasm male fertility from sterility

&lt;130&gt; A11143MA

&lt;160&gt; 3

## 【0114】

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 8553

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Raphanus sativus

&lt;400&gt; 1

gttaacgtgt	tcattatcca	ctaaaaactg	aaattcataa	aatacacaat	tgtatata	60
atccggatg	attcatcccc	aaaactccga	ctctaatact	aaaacaggat	aagcaagacc	120
acctaata	aatattaaga	aggaaaaaca	aatcagaatc	tagaatcgca	ggaaataaac	180
acagacccta	ttgcctatt	ctcatagctt	catcataagc	atcatataca	tatattttca	240
aatgcgtat	ttacacaggt	tgtcacaaga	aaagcattga	agtatttttc	tcacttac	300
taactcagtt	ttcgtcacct	tacacaatgc	aatgttgact	ctttcttga	tccaaaccact	360
gggagtaatc	tctaaaaaaa	gttagaccaa	gcactgaaaa	caattagaat	ataacatttg	420
catctcctca	cccagagaga	tgacaacaca	aatacttctt	catcttggac	attgtgtat	480
gtttgagaga	gagatgcaaa	acgggtgggt	tccggtttat	aagtggagc	caaaccgtt	540
tagtatcgat	ttttagttca	tatgatcaat	ctctactctc	taaccggttt	tactatcaag	600
aaagaaaaaa	gagaagctt	tagagttgt	atttctcg	tctggttct	ttgttgatta	660
acaaaagctt	aagcaataat	agaatgaatc	tgcaagttt	ttctacttat	ggtaaattga	720
tttcatagca	atttggagat	aaagaatgaa	gctaaagcaag	tcaagaggcg	aaccagagaa	780
gcataagcga	caacaacatt	tccaccaaga	ttaaaagaac	atgatctcct	cctgaaccca	840
catgggagca	gacaaggcag	gacagagcca	atatgaagaa	gaggaggaag	atggcatcac	900
agctatcagc	tctcatgaag	accgagctt	acgataacca	tggtgacagc	tacagaacgg	960

gcagacacct aaacatctt taacacctga aatcttctgg aaggtgtgcc tcttagttc 1020  
agaccaataa tcttcgtga aacaagtgtt tggaaatgg tcaaattat 1080  
taagcccaga caatagacgc ataaaaggct gtcattagaa tagcagcaaa ataacttact 1140  
aaccacacaa ttttcacta tgatcactt attcaacgtt ttgatcaaac attagtaggg 1200  
tatacatgca gcagcagaaa caaatgaca ttgaagctct gctgcgcaaa cagaagaaaa 1260  
tcttgatca ttcatcccccaaatgataga tcctacaatg caaaaccaaa ccaatggta 1320  
attccagaac gtgtatcatc aatctgaagc tacacacaaa agaatgtata cattttgtt 1380  
tatataaaaa atacatagac tgaacagaaa cttacatacc atactcatct gcagttctc 1440  
aagcattgcc actgccctt ttagttccctc tttactccat aaaccagtca gcatattgcg 1500  
gatggtaatg gtatcaggat acacaccact tgaaatcatc tcctggaaaa tgtctagagc 1560  
cccatataa ttacccactt tacgaaaacc acaaataaa gtgatgtaag taattgcgtt 1620  
agcaactatc cctttcgac ccatctcgca gaaaagctcc agcccatcat caacccttcc 1680  
tgccttacag tagccattaa tgagtgttgtt aaaggtcact acgtttggag agaagcttt 1740  
gctacccatc gaatcaaaca tttgtgtgc ctcattctagg cggctctgct tgcataatcc 1800  
atcgatcatt gagctatagg tgatagtatc tggactata cccctgtggg gcatctcc 1860  
gtataattcc tcggcctcta aaaacttccc ttcattgtac aagccgctga tcaatataatt 1920  
gtaagttga acatcagggtt ccacaccatt gaaggggtga ctagcatcaa gatccttctt 1980  
actcttctgc ataaccttaa acatttccaa tgcattttt agttccat tatgcagag 2040  
accatccagc aaagtgtcac aagtaacgtt atcagggcac aaaccactag agatcatctc 2100  
ttgtaaaagg tctagagcag cattaagatc gcccaccaga tagaaccgtt gaataagagt 2160  
gttgtaagta gttgtgtcag caactaatcc tggatgttc atctcatggta gaagttccat 2220  
tccatcatct atcctttag ccccaataa tccgtctatg agagtattga aagtgatttag 2280  
gttggagag cagcccttgg tagccatcaa ataaaacatg tgctcagcag catcaagacg 2340  
attctgtttt caaaatccat cgatcatgtt actatatgtt attgtatttag ggattatacc 2400  
ccttggaaagc atctcatcgt ataattttcc agcctcaaag aacttgcctt cttgacaaa 2460  
tgcattgtac aaagcattat aagttacaac atcagggctg atcttccctt ctaacatttc 2520  
ttgcaacaac tgctccgcgt cgctccatct accagagcta caaaaaccaaa ctatcatact 2580  
gttgtaggtt aataaatcgg gaaagattcc tttctttgc atttcagtgtt aaagattttt 2640  
tgcatcgcta tgacgtccgt cttaacaaag gctatcaatg attgcactat agattacaac 2700

attgggtatg atgtggctca ctcctccat cttcctcagc agattcagt cagacacagt 2760  
atctcccttc ttacacatcc catctacgat tttccataa gtaatctgg taggctggag 2820  
accatcttcc atcatccgat caagcagagc tacggcttc acaattctac ctcgcggca 2880  
aagaccgttc atcaaagtgg tgaaggttac gacattgggc ctacatgtcg tttcaaacat 2940  
ttgatgaaaa aaatccaagg cttcagaaac cctatcttcc acacataatc catggagcag 3000  
ggtggtgaag gtaacaacat cagggtggag tccaagcttg gtgatcttac caaatgtaga 3060  
caaagcaaag gggagcttag agcagctgca gaaacattt atcagaatat tgaagctgta 3120  
tatatcacat cgaatctgtt tccttccat cttctgatag agagaaatca caagatccgg 3180  
gcgttccatt ctcaccacca cacccatcaa tttacagaaa tcaaccacag aaggtaaagg 3240  
acgagatcga agcatgtcac tgaacaaatc aatcgcatcc tctaaacctt tgatttcatg 3300  
aaacccactt tgcatgttca aactcttcc tccaaaacct gcttcgcaac tctctccgct 3360  
tgccttggcc agagtatcac gaatcgatct cgtacagaac aatctagccg cagactcagc 3420  
aggagaagaa gaacacttga atccacaaac cctagccaaac atttattt tgttcgccct 3480  
aaatttgtt cttcgatctt cttttttttt aactcgatc tgagaaaata aacgagagat 3540  
aaagtacaaa cgggttccat ttgtttaca agaaccgggtt cagttgaat tatacaattt 3600  
ccggttccaga ttgttccat cttcgatctt cttttttttt aactcgatc tgatccatc 3660  
atgattcact aaacccagag ccgagagaaa ttgataaacc gagctattga aaccagtaga 3720  
gttccgggttc agtattttt actaaggcctt cttttttttt ccactttttt aatcaagac 3780  
gaccaatcaa agaccatttta cagactatcc acttctaaaa ttattaaacg atctaaaaaa 3840  
tttatcaaca gccaggtgtt ttaataattt atattagg aaccagttaa tgacatcccc 3900  
attgaaccag ttaatgacat tttttttttt gttataagct aactttttt ataaacaaag 3960  
ttttttttt tggagaacc ttggccatca atatcatccc ctattttttt caactctttaa 4020  
gtaactaaac atttgactca aaactaaattt ggatatgtac ataaacaatg agttggacat 4080  
accacactgc aatgagaagg aatcgagaat ctccatacta attagaaaga cctaaccaaa 4140  
atctaaccata ttaatttttt gttttttttt ttatctactg ttcagagttt ggctggacaa 4200  
aaaaactgaa tccaaagaac cgaaccgaat ccgatctgca aaagtaatac caaatccgaa 4260  
ccgaaattaa ttgaatatcc gaataggtttt aaattttttt tattttaaaga accaaaacccg 4320  
aaccggatcc gaaccaaaat atttggata tccgaatgtt tccgaatgtt attaatatac 4380  
atatatattt aactatTTTt agattgaata tatattaaaa agcatctaaa atatatataa 4440

tactttaaa ttgttcaaaa tactagaaaa tatataaaaa cattaaaaag tacatgtata 4500  
aatagttaaa gcatactcaa aacaccaaaa atatataaaa tatgattgat tttctatcca 4560  
aatatccaaa tcaaaccaat ttacatgtta agtttggta cttcgacaca tattattgaa 4620  
atttatatgt aatatattat tttgtttaca aatttcgaaa agttaaaat atataatgaa 4680  
atttaaaat tttgaaaata atttaaacgg gttatccgaa cccgaaccga atccgcaagg 4740  
atccgaaccg aacccgaacc gtaatttaga aataaccgaa tggggctaaa atcttgacc 4800  
ccaaaaatcc gaaatccgaa tagactcgaa ccgaaacccg aataggtacc cgaacgccc 4860  
cccctagttc aaagatttagg accacttagt taaatattta atatgacata tatgtttatt 4920  
tatattaaat cttataatac aaaaaaaaaa aaaatcaatt ttaacaatac atttgaattt 4980  
tattttagct ataacaaaat ttgttggaaa aaatctaaca aaatcctacc caacgtttta 5040  
aatatttatt ataaaataat gtattaatta attttgcaa ttagtaatat aataatatta 5100  
taattattgt tatttagaat ttatcataa aacaatgaaa ataaaaaatt atgctattt 5160  
ataaatttt cattataatac tatgttgc tcaaatacgag gtgttctaaa ctaaatataa 5220  
aagatgtcaa aaaaaaatga actaaatata aaataatata ttaaatttggc tgattaaatc 5280  
tattttaaa atactttat gtaaataaat ttatcactca cggttaaaac attgttaagag 5340  
cagctctgct cgccccctt tttgcttctt ctgttctcaa aaacttgatg aaatcacaga 5400  
aactgagtca agtataatgat caggaacaca gaacaagtga taaacaaaat ctatgaatat 5460  
gttggtagtg ataggagata aaacactact tgattccatg gaaaacgtca ccaacggcgc 5520  
aataagaatc aatagagaag cgtagctatt ctgtaatcat aaccgatgga atgcacccat 5580  
aaaataaaaat tatctaggga ttgttaattt gaaaagaaaa atgtcttca ttctttatg 5640  
ggtcaattttag gggaaaggc aacttttaag tttgaattttag aaaaataggc cacctcaagt 5700  
ttatatttagg caattggca accttagtata gagaataa atttatgaca ttttaacct 5760  
ttttgcctat taaacttggc aagttggaaa agtaatttgc tgggacccaa aatccactt 5820  
gcctataaaa aataattttt ttccactaa cttaaccaa ctaacttttgc taaattccat 5880  
aacattctt tattcattaa acttttggat catatttaat attaaaaat catatatgag 5940  
caactacttt taatataata catatttttt catatataaa gtcaacataa atctatacga 6000  
attaatataa aatcgatgta aattctaaaa tttatgaaag ttacccaata aattatacat 6060  
tttgactcat aaaagaaaact ttcatattta tggaaatctac ccaataaat gataattcat 6120  
aaaattatgt aaatttatgg ataattatca taaatctgag taaatttaat aaacttggaa 6180

actttcatac atccatttcatt ttttgcacaa atggcaggaa aacaatgg tctacattt 6240  
attttaatat agttggtaa attaataaa tttggaaacc tacgtgaatc ttacatttt 6300  
tttggtaa aattgatctc acacttttgc ttttgcacaa aaatagaaac actcacgaaa 6360  
tgctacattt tttcccaaa aataaaatga caaattggtaa tctggcagca aagtgcattc 6420  
gttataattt tcattttat aaaaatgacaa aaattgttaa tgaaatgaca aatttggtaa 6480  
taaaatgaca aaccctacac ctttcacat gaactgatct aataacttta atttcaagg 6540  
atcatatcta cttgttagaa ccaatataat cccatattga gtacaacctg cagatttcca 6600  
atcatccaa gttcttgatt agtcataggt agagccgtgc ttataatcta tgaaaaaaga 6660  
tatccgctat agtgcattt caccccaaaa aatagagttt tccttaggtt cacccctaga 6720  
gtgaacattt aggttcaccc aaccaatagg aatcaagtat ttcataatta atatttttt 6780  
taaaaagaaaa agaaaaatattt gtcaagttt attatgtttt taaaataaaat aaaaataaaa 6840  
aaaaaaataa tagccgttac aaaaaatgaa ttttgaaaaa ctattttaa tatcgtaaaa 6900  
aaacactaaa ccttaaacc accctaaacc cttgggtata ccctaaaccc 6960  
ttggataattt ttaaactcta aaccctaaac cctaaattctt aaccctaaa ccctaaatcc 7020  
taaaccctaa acccttgggtt ataccctaga cccttggata attttaaact ctaaaccctta 7080  
aaccctaaat tctaaaccctt aacccttggg ataaatcata aacacttgga taatcctaaa 7140  
ttctaaatca aaaacactaa acactaaaac attaaatctt aaaaatacta ttatggttt 7200  
atgtttttaa tttagggttt agtatttac caagggtta ggatttagag tttagagttt 7260  
agtgtttgt tgacgaaattt aaaaatctt taaaaatctt tttttttgc atatattttt 7320  
atttttattt tttaatattt ttatttaaa aatgtaatat aactcgacaa tattttgttt 7380  
actttttaa aagatataa ctgtgaaatg agtggattctt attgggttgggtt gaaccttaag 7440  
gtttactcta ggggtacacc aagattaatg ccaaaaaata taggataattt tggcctcc 7500  
atgtcaagta tcttagtggattttatgtttt aagaagttaa gactcaaccc gagtttgacc 7560  
aaattctctc gcataaaactt cttatcttaa atattttaaa tcatcaacaa aacactaaac 7620  
ataaaactcctt aaactctaaa ccatgaatcc taaatctgga atccttgggtt aaatccggaa 7680  
cccttgggtt aatccagaat ccgaataat tatacattttt gaccataaaa agaaactttc 7740  
atattttatga aatttacccaa aataaaatgat aaattattca taaaattata taaattttatg 7800  
gataattttc ataaatctgg gtaaatttaa taaacttgga aacctacata gatcttcat 7860  
tttttgcataa aatggtagga agaacaattt tgtctacattt tatcttaat attaaaaatc 7920

atcaacaaaa cactaacctt aaaatcctaa actctaaacc ttgaatccta aatccggaac 7980  
 ccttggtaa atccagaacc attggtaaa tccagaatct gaaacaatct ggaacccttg 8040  
 gataaatccg gaaccctatg tctaacgtt aatacaatct aattcactat aactcaagaa 8100  
 ataagtatac gtatacataa gatgtacgaa tatctaaggt gttcgaatat ataaggtgta 8160  
 cgtatacata agtatacata aggtgtacga ataccttagg tgtacaataa cctaagggt 8220  
 acgaataacct aaggtaatac gaaggtgtac gaatacataa ggtgtacgaa tatcaacata 8280  
 actcatctaa tacttaagat gtacaaatac ataaggtgta catatacata agtatacata 8340  
 aggtgtacaa atacataaaa tatacgaata ccaacataac ccatcgaata cttaaagggt 8400  
 acgaatacac aagtataatgt atacataagt atacatataat ttaaggta cgaatacatc 8460  
 ggtgtacgaa tacataacat ctatgaatac ctttgtta tatcccttat tgcattggag 8520  
 agtttaataa catattaagt ataaaattta aat 8553

## 【0115】

<210> 2  
 <211> 2415  
 <212> DNA  
 <213> Raphanus sativus  
 <400> 2

atg gag gca cca aat tat cct ata ttt ttt gga ctt aat ctt ggt gta 48

Met Glu Ala Pro Asn Tyr Pro Ile Phe Phe Gly Leu Asn Leu Gly Val

1 5 10 15

ccc cta gag ggt ggg cgt tcg ggt acc tat tcg ggt ttc ggt tcg agt 96

Pro Leu Glu Gly Gly Arg Ser Gly Thr Tyr Ser Gly Phe Gly Ser Ser

20 25 30

cta ttc gga ttt cgg att ttt ggg gtc aaa gat ttt agc ccc att cgg 144

Leu Phe Gly Phe Arg Ile Phe Gly Val Lys Asp Phe Ser Pro Ile Arg

35 40 45

tta ttt cta aat tac ggt tcg ggt tcg gtt cgg atc ctt gcg gat tcg 192

Leu Phe Leu Asn Tyr Gly Ser Gly Ser Val Arg Ile Leu Ala Asp Ser

50 55 60

tca cga gtt ttt ttt aga gat cga cga aga aca aaa ttt agg cga aac 240  
 Ser Arg Val Phe Phe Arg Asp Arg Arg Arg Thr Lys Phe Arg Arg Asn  
 65 70 75 80  
 aaa aat aaa atg ttg gct agg gtt tgt gga ttc aag tgt tct tct tct 288  
 Lys Asn Lys Met Leu Ala Arg Val Cys Gly Phe Lys Cys Ser Ser Ser  
 85 90 95  
 cct gct gag tct gcg gct aga ttg ttc tgt acg aga tcg att cgt gat 336  
 Pro Ala Glu Ser Ala Ala Arg Leu Phe Cys Thr Arg Ser Ile Arg Asp  
 100 105 110  
 act ctg gcc aag gca agc gga gag agt tgc gaa gca ggt ttt gga gga 384  
 Thr Leu Ala Lys Ala Ser Gly Glu Ser Cys Glu Ala Gly Phe Gly Gly  
 115 120 125  
 gag agt ttg aag ctg caa agt ggg ttt cat gaa atc aaa ggt tta gag 432  
 Glu Ser Leu Lys Leu Gln Ser Gly Phe His Glu Ile Lys Gly Leu Glu  
 130 135 140  
 gat gcg att gat ttg ttc agt gac atg ctt cga tct cgt cct tta cct 480  
 Asp Ala Ile Asp Leu Phe Ser Asp Met Leu Arg Ser Arg Pro Leu Pro  
 145 150 155 160  
 tct gtg gtt gat ttc tgt aaa ttg atg ggt gtg gtg gtg aga atg gaa 528  
 Ser Val Val Asp Phe Cys Lys Leu Met Gly Val Val Val Arg Met Glu  
 165 170 175  
 cgc ccg gat ctt gtg att tct ctc tat cag aag atg gaa agg aaa cag 576  
 Arg Pro Asp Leu Val Ile Ser Leu Tyr Gln Lys Met Glu Arg Lys Gln  
 180 185 190  
 att cga tgt gat ata tac agc ttc aat att ctg ata aaa tgt ttc tgc 624  
 Ile Arg Cys Asp Ile Tyr Ser Phe Asn Ile Leu Ile Lys Cys Phe Cys  
 195 200 205  
 agc tgc tct aag ctc ccc ttt gct ttg tct aca ttt ggt aag atc acc 672  
 Ser Cys Ser Lys Leu Pro Phe Ala Leu Ser Thr Phe Gly Lys Ile Thr

210	215	220	
aag ctt gga ctc cac cct gat gtt gtt acc ttc acc acc ctg ctc cat			720
Lys Leu Gly Leu His Pro Asp Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Leu His			
225	230	235	240
gga tta tgt gtg gaa gat agg gtt tct gaa gcc ttg gat ttt ttt cat			768
Gly Leu Cys Val Glu Asp Arg Val Ser Glu Ala Leu Asp Phe Phe His			
245	250	255	
caa atg ttt gaa acg aca tgt agg ccc aat gtc gta acc ttc acc act			816
Gln Met Phe Glu Thr Thr Cys Arg Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr			
260	265	270	
ttg atg aac ggt ctt tgc cgc gag ggt aga att gtc gaa gcc gta gct			864
Leu Met Asn Gly Leu Cys Arg Glu Gly Arg Ile Val Glu Ala Val Ala			
275	280	285	
ctg ctt gat cgg atg atg gaa gat ggt ctc cag cct acc cag att act			912
Leu Leu Asp Arg Met Met Glu Asp Gly Leu Gln Pro Thr Gln Ile Thr			
290	295	300	
tat gga aca atc gta gat ggg atg tgt aag aag gga gat act gtg tct			960
Tyr Gly Thr Ile Val Asp Gly Met Cys Lys Lys Gly Asp Thr Val Ser			
305	310	315	320
gca ctg aat ctg ctg agg aag atg gag gag gtg agc cac atc ata ccc			1008
Ala Leu Asn Leu Leu Arg Lys Met Glu Glu Val Ser His Ile Ile Pro			
325	330	335	
aat gtt gta atc tat agt gca atc att gat agc ctt tgt aaa gac gga			1056
Asn Val Val Ile Tyr Ser Ala Ile Ile Asp Ser Leu Cys Lys Asp Gly			
340	345	350	
cgt cat agc gat gca caa aat ctt ttc act gaa atg caa gag aaa gga			1104
Arg His Ser Asp Ala Gln Asn Leu Phe Thr Glu Met Gln Glu Lys Gly			
355	360	365	
atc ttt ccc gat tta ttt acc tac aac agt atg ata gtt ggt ttt tgt			1152

Ile Phe Pro Asp Leu Phe Thr Tyr Asn Ser Met Ile Val Gly Phe Cys  
 370 375 380  
 agc tct ggt aga tgg agc gac gcg gag cag ttg ttg caa gaa atg tta 1200  
 Ser Ser Gly Arg Trp Ser Asp Ala Glu Gln Leu Leu Gln Glu Met Leu  
 385 390 395 400  
 gaa agg aag atc agc cct gat gtt gta act tat aat gct ttg atc aat 1248  
 Glu Arg Lys Ile Ser Pro Asp Val Val Thr Tyr Asn Ala Leu Ile Asn  
 405 410 415  
 gca ttt gtc aag gaa ggc aag ttc ttt gag gct gaa gaa tta tac gat 1296  
 Ala Phe Val Lys Glu Gly Lys Phe Phe Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Asp  
 420 425 430  
 gag atg ctt cca agg ggt ata atc cct aat aca atc aca tat agt tca 1344  
 Glu Met Leu Pro Arg Gly Ile Ile Pro Asn Thr Ile Thr Tyr Ser Ser  
 435 440 445  
 atg atc gat gga ttt tgc aaa cag aat cgt ctt gat gct gct gag cac 1392  
 Met Ile Asp Gly Phe Cys Lys Gln Asn Arg Leu Asp Ala Ala Glu His  
 450 455 460  
 atg ttt tat ttg atg gct acc aag ggc tgc tct ccc aac cta atc act 1440  
 Met Phe Tyr Leu Met Ala Thr Lys Gly Cys Ser Pro Asn Leu Ile Thr  
 465 470 475 480  
 ttc aat act ctc ata gac gga tat tgt ggg gct aag agg ata gat gat 1488  
 Phe Asn Thr Leu Ile Asp Gly Tyr Cys Gly Ala Lys Arg Ile Asp Asp  
 485 490 495  
 gga atg gaa ctt ctc cat gag atg act gaa aca gga tta gtt gct gac 1536  
 Gly Met Glu Leu Leu His Glu Met Thr Glu Thr Gly Leu Val Ala Asp  
 500 505 510  
 aca act act tac aac act ctt att cac ggg ttc tat ctg gtg ggc gat 1584  
 Thr Thr Thr Tyr Asn Thr Leu Ile His Gly Phe Tyr Leu Val Gly Asp  
 515 520 525

ctt aat gct gct cta gac ctt tta caa gag atg atc tct agt ggt ttg 1632  
 Leu Asn Ala Ala Leu Asp Leu Leu Gln Glu Met Ile Ser Ser Gly Leu  
 530 535 540  
 tgc cct gat atc gtt act tgt gac act ttg ctg gat ggt ctc tgc gat 1680  
 Cys Pro Asp Ile Val Thr Cys Asp Thr Leu Leu Asp Gly Leu Cys Asp  
 545 550 555 560  
 aat ggg aaa cta aaa gat gca ttg gaa atg ttt aag gtt atg cag aag 1728  
 Asn Gly Lys Leu Lys Asp Ala Leu Glu Met Phe Lys Val Met Gln Lys  
 565 570 575  
 agt aag aag gat ctt gat gct agt cac ccc ttc aat ggt gtg gaa cct 1776  
 Ser Lys Lys Asp Leu Asp Ala Ser His Pro Phe Asn Gly Val Glu Pro  
 580 585 590  
 gat gtt caa act tac aat ata ttg atc agc ggc ttg atc aat gaa ggg 1824  
 Asp Val Gln Thr Tyr Asn Ile Leu Ile Ser Gly Leu Ile Asn Glu Gly  
 595 600 605  
 aag ttt tta gag gcc gag gaa tta tac gag gag atg ccc cac agg ggt 1872  
 Lys Phe Leu Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Glu Glu Met Pro His Arg Gly  
 610 615 620  
 ata gtc cca gat act atc acc tat agc tca atg atc gat gga tta tgc 1920  
 Ile Val Pro Asp Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met Ile Asp Gly Leu Cys  
 625 630 635 640  
 aag cag agc cgc cta gat gag gct aca caa atg ttt gat tcg atg ggt 1968  
 Lys Gln Ser Arg Leu Asp Glu Ala Thr Gln Met Phe Asp Ser Met Gly  
 645 650 655  
 agc aag agc ttc tct cca aac gta gtg acc ttt act aca ctc att aat 2016  
 Ser Lys Ser Phe Ser Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Ile Asn  
 660 665 670  
 ggc tac tgt aag gca gga agg gtt gat gat ggg ctg gag ctt ttc tgc 2064  
 Gly Tyr Cys Lys Ala Gly Arg Val Asp Asp Gly Leu Glu Leu Phe Cys

675	680	685
gag atg ggt cga aga ggg ata gtt gct aac gca att act tac atc act 2112		
Glu Met Gly Arg Arg Gly Ile Val Ala Asn Ala Ile Thr Tyr Ile Thr		
690	695	700
ttg att tgt ggt ttt cgt aaa gtg ggt aat att aat ggg gct cta gac 2160		
Leu Ile Cys Gly Phe Arg Lys Val Gly Asn Ile Asn Gly Ala Leu Asp		
705	710	715
att ttc cag gag atg att tca agt ggt gtg tat cct gat acc att acc 2208		
Ile Phe Gln Glu Met Ile Ser Ser Gly Val Tyr Pro Asp Thr Ile Thr		
725	730	735
atc cgc aat atg ctg act ggt tta tgg agt aaa gag gaa cta aaa agg 2256		
Ile Arg Asn Met Leu Thr Gly Leu Trp Ser Lys Glu Glu Leu Lys Arg		
740	745	750
gca gtg gca atg ctt gag aaa ctg cag atg agt atg gta tat tat tgg 2304		
Ala Val Ala Met Leu Glu Leu Gln Met Ser Met Val Tyr Tyr Trp		
755	760	765
tct gaa cta aag agg cac acc ttc cag aag att tca ggt gtt aaa aga 2352		
Ser Glu Leu Lys Arg His Thr Phe Gln Lys Ile Ser Gly Val Lys Arg		
770	775	780
tgt tta ggt gtc tgc ccg ttc tgt agc tgt cac cat ggt tat cgt caa 2400		
Cys Leu Gly Val Cys Pro Phe Cys Ser Cys His His Gly Tyr Arg Gln		
785	790	795
gct cgg tct tca tga 2415		
Ala Arg Ser Ser Stop		
805		

【0116】

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 804

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Raphanus sativus

&lt;400&gt; 3

Met Glu Ala Pro Asn Tyr Pro Ile Phe Phe Gly Leu Asn Leu Gly Val  
 1 5 10 15

Pro Leu Glu Gly Gly Arg Ser Gly Thr Tyr Ser Gly Phe Gly Ser Ser  
 20 25 30

Leu Phe Gly Phe Arg Ile Phe Gly Val Lys Asp Phe Ser Pro Ile Arg  
 35 40 45

Leu Phe Leu Asn Tyr Gly Ser Gly Ser Val Arg Ile Leu Ala Asp Ser  
 50 55 60

Ser Arg Val Phe Phe Arg Asp Arg Arg Arg Thr Lys Phe Arg Arg Asn  
 65 70 75 80

Lys Asn Lys Met Leu Ala Arg Val Cys Gly Phe Lys Cys Ser Ser Ser  
 85 90 95

Pro Ala Glu Ser Ala Ala Arg Leu Phe Cys Thr Arg Ser Ile Arg Asp  
 100 105 110

Thr Leu Ala Lys Ala Ser Gly Glu Ser Cys Glu Ala Gly Phe Gly Gly  
 115 120 125

Glu Ser Leu Lys Leu Gln Ser Gly Phe His Glu Ile Lys Gly Leu Glu  
 130 135 140

Asp Ala Ile Asp Leu Phe Ser Asp Met Leu Arg Ser Arg Pro Leu Pro  
 145 150 155 160

Ser Val Val Asp Phe Cys Lys Leu Met Gly Val Val Val Arg Met Glu  
 165 170 175

Arg Pro Asp Leu Val Ile Ser Leu Tyr Gln Lys Met Glu Arg Lys Gln  
 180 185 190

Ile Arg Cys Asp Ile Tyr Ser Phe Asn Ile Leu Ile Lys Cys Phe Cys  
 195 200 205

Ser Cys Ser Lys Leu Pro Phe Ala Leu Ser Thr Phe Gly Lys Ile Thr

210	215	220
Lys Leu Gly Leu His Pro Asp Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Leu His		
225	230	235
Gly Leu Cys Val Glu Asp Arg Val Ser Glu Ala Leu Asp Phe Phe His		
245	250	255
Gln Met Phe Glu Thr Thr Cys Arg Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr		
260	265	270
Leu Met Asn Gly Leu Cys Arg Glu Gly Arg Ile Val Glu Ala Val Ala		
275	280	285
Leu Leu Asp Arg Met Met Glu Asp Gly Leu Gln Pro Thr Gln Ile Thr		
290	295	300
Tyr Gly Thr Ile Val Asp Gly Met Cys Lys Lys Gly Asp Thr Val Ser		
305	310	315
Ala Leu Asn Leu Leu Arg Lys Met Glu Glu Val Ser His Ile Ile Pro		
325	330	335
Asn Val Val Ile Tyr Ser Ala Ile Asp Ser Leu Cys Lys Asp Gly		
340	345	350
Arg His Ser Asp Ala Gln Asn Leu Phe Thr Glu Met Gln Glu Lys Gly		
355	360	365
Ile Phe Pro Asp Leu Phe Thr Tyr Asn Ser Met Ile Val Gly Phe Cys		
370	375	380
Ser Ser Gly Arg Trp Ser Asp Ala Glu Gln Leu Leu Gln Glu Met Leu		
385	390	395
Glu Arg Lys Ile Ser Pro Asp Val Val Thr Tyr Asn Ala Leu Ile Asn		
405	410	415
Ala Phe Val Lys Glu Gly Lys Phe Phe Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Asp		
420	425	430
Glu Met Leu Pro Arg Gly Ile Ile Pro Asn Thr Ile Thr Tyr Ser Ser		
435	440	445

Met Ile Asp Gly Phe Cys Lys Gln Asn Arg Leu Asp Ala Ala Glu His  
 450 455 460  
 Met Phe Tyr Leu Met Ala Thr Lys Gly Cys Ser Pro Asn Leu Ile Thr  
 465 470 475 480  
 Phe Asn Thr Leu Ile Asp Gly Tyr Cys Gly Ala Lys Arg Ile Asp Asp  
 485 490 495  
 Gly Met Glu Leu Leu His Glu Met Thr Glu Thr Gly Leu Val Ala Asp  
 500 505 510  
 Thr Thr Thr Tyr Asn Thr Leu Ile His Gly Phe Tyr Leu Val Gly Asp  
 515 520 525  
 Leu Asn Ala Ala Leu Asp Leu Leu Gln Glu Met Ile Ser Ser Gly Leu  
 530 535 540  
 Cys Pro Asp Ile Val Thr Cys Asp Thr Leu Leu Asp Gly Leu Cys Asp  
 545 550 555 560  
 Asn Gly Lys Leu Lys Asp Ala Leu Glu Met Phe Lys Val Met Gln Lys  
 565 570 575  
 Ser Lys Lys Asp Leu Asp Ala Ser His Pro Phe Asn Gly Val Glu Pro  
 580 585 590  
 Asp Val Gln Thr Tyr Asn Ile Leu Ile Ser Gly Leu Ile Asn Glu Gly  
 595 600 605  
 Lys Phe Leu Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Glu Glu Met Pro His Arg Gly  
 610 615 620  
 Ile Val Pro Asp Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met Ile Asp Gly Leu Cys  
 625 630 635 640  
 Lys Gln Ser Arg Leu Asp Glu Ala Thr Gln Met Phe Asp Ser Met Gly  
 645 650 655  
 Ser Lys Ser Phe Ser Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Ile Asn  
 660 665 670  
 Gly Tyr Cys Lys Ala Gly Arg Val Asp Asp Gly Leu Glu Leu Phe Cys

675	680	685	
Glu Met Gly Arg Arg Gly Ile Val Ala Asn Ala Ile Thr Tyr Ile Thr			
690	695	700	
Leu Ile Cys Gly Phe Arg Lys Val Gly Asn Ile Asn Gly Ala Leu Asp			
705	710	715	720
Ile Phe Gln Glu Met Ile Ser Ser Gly Val Tyr Pro Asp Thr Ile Thr			
725	730	735	
Ile Arg Asn Met Leu Thr Gly Leu Trp Ser Lys Glu Glu Leu Lys Arg			
740	745	750	
Ala Val Ala Met Leu Glu Lys Leu Gln Met Ser Met Val Tyr Tyr Trp			
755	760	765	
Ser Glu Leu Lys Arg His Thr Phe Gln Lys Ile Ser Gly Val Lys Arg			
770	775	780	
Cys Leu Gly Val Cys Pro Phe Cys Ser Cys His His Gly Tyr Arg Gln			
785	790	795	800
Ala Arg Ser Ser			
804			

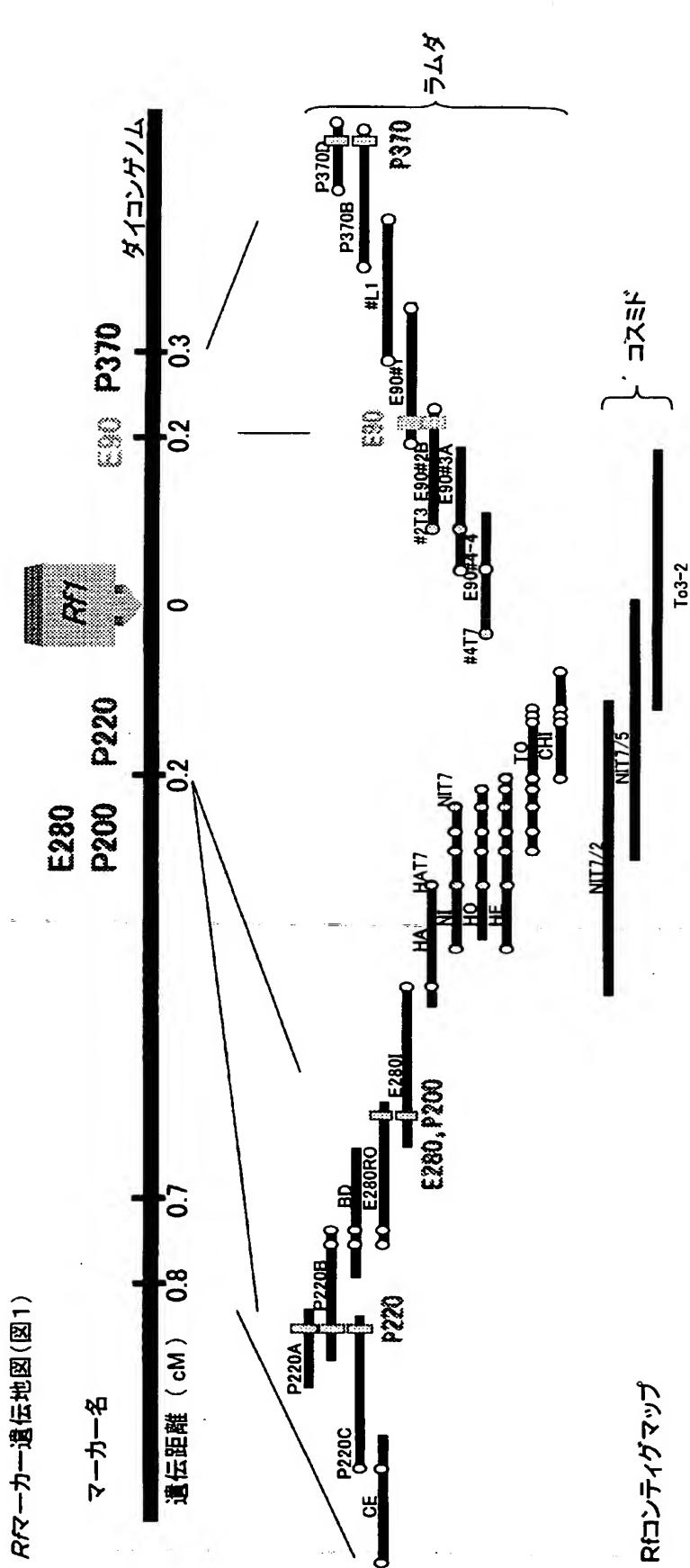
## 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

図1は、R f マーカー遺伝地図を示す。

【書類名】 図面

【図1】



Rfコンティグマップ

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】  $R_f$  遺伝子、特に、ダイコン由来の  $R_f 1$  遺伝子を単離してその構造を同定すること。

【解決手段】 下記の何れかのDNA。

- (1) 配列番号1に記載の塩基配列を有するDNA；
- (2) 配列番号1に記載の塩基配列において1から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA；又は
- (3) 配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAとストリングエントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA。

【選択図】 なし

特願2001-128008

出願人履歴情報

識別番号 [000005968]

1. 変更年月日 1994年10月20日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号  
氏 名 三菱化学株式会社